

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

UER XAVIER BICHAT

UNIVERSITE PARIS VII

54

THESE
pour le
DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

Jacques VATIER

NE LE 23 JUILLET 1935 A PARIS (XVIII)

PHARMACIEN, ANCIEN INTERNE DES HOPITAUX DE PARIS

Présentée et soutenue publiquement le 9 Juin 1971

DEFINITION D'UNE METHODE D'ISOLEMENT DE LA GASTRINE ANTRALE
APPLICATION A L'ETUDE DES URINES D'UN SYNDROME D'HYPERGASTRINIE
(SYNDROME DE ZOLLINGER-ELLISON)

PRESIDENT: M. CHARLES DEBRAY, PROFESSEUR.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550415_0043

FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

UER XAVIER BICHAT

UNIVERSITE PARIS VII

THESE
pour le
DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

par

Jacques VATIER

NE LE 23 JUILLET 1935 A PARIS (XVIII)

PHARMACIEN, ANCIEN INTERNE DES HOPITAUX DE PARIS

Présentée et soutenue publiquement le 9 Juin 1971

DEFINITION D'UNE METHODE D'ISOLEMENT DE LA GASTRINE ANTRALE
APPLICATION A L'ETUDE DES URINES D'UN SYNDROME D'HYPERGASTRINIE
(SYNDROME DE ZOLLINGER-ELLISON)

PRESIDENT: M. CHARLES DEBRAY, PROFESSEUR.

THESE

DE

DOCTORAT EN MÉDECINE

THESE

DE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(1811-1812)

1811

JACQUES VATTIER

DE



DE

DE

DE

DE

DE

DE

A MA FEMME

en témoignage de mon amour.

Je la remercie pour tous les sacrifices qu'elle a acceptés
afin de me permettre d'accomplir mes études médicales.

A MES ENFANTS : Anne, Olivier, Eric.

A MA GRAND'MERE

A MA MARRAINE ET A MON ONCLE

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

En témoignage de mon affection.

A Monsieur le Professeur Charles DEBRAY

Professeur d'Hydrologie et Climatologie à la

Faculté de Médecine Xavier-Bichat

Médecin de l'Hôpital Bichat

qui a bien voulu accepter la Présidence de cette thèse.

A Monsieur le Professeur Serge BONFILS

Professeur à la Faculté de Médecine Xavier-Bichat

Médecin de l'Hôpital Bichat

Il m'a fait découvrir la Recherche Médicale.

Il a su guider mon travail et ma vie de Chercheur
avec une paternelle attention.

Qu'il trouve ici l'expression de ma
profonde gratitude.

A nos Maîtres dans les Hôpitaux

Monsieur le Professeur R.G. DOURIS

Pharmacien des Hôpitaux de Paris

Monsieur le Professeur G. LE MOAN

Pharmacien des Hôpitaux de Paris

Pharmacien de l'Hôpital Bichat.

A tous les Membres de l'Unité U. 10 de l'I.N.S.E.R.M.

et plus spécialement à tous ceux
qui ont contribué à ce travail de Recherche
qui ne pouvait être conçu et entrepris qu'en
Equipe et que seul je n'aurais pu mener à son terme.

Mes plus vifs remerciements.

A Monsieur et Madame HENRY

A Madame MATHERON CLAUSSE

A TOUT LE PERSONNEL D'EURORGA

avec mes plus vifs remerciements.

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION

II. DESCRIPTION DES TECHNIQUES UTILISEES

A - Techniques biochimiques

1°- Chromatographies

2°- Hydrolyse acide

3°- Analyse des acides aminés.

B - Tests biologiques

1°- Chez le Rat

2°- Chez le chien

III. ISOLEMENT DE LA GASTRINE DU PORC

A - Modalités d'extraction et d'isolement de la Gastrine

B - Résultats.

IV. APPLICATION DES METHODES D'ISOLEMENT ET DE PURIFICATION DE LA GASTRINE AUX FACTEURS GASTROSECRETAGOGUES URINAIRES

A - Introduction

B - Cas cliniques

C - Protocole expérimental

D - Résultats

V. CONCLUSIONS

I.- INTRODUCTION

Des connaissances actuelles sur la physiologie de la sécrétion gastrique, il ressort que l'on peut dégager deux mécanismes plus ou moins distincts de stimulation des cellules principales et des cellules pariétales du fundus. Il existe d'une part, une stimulation d'origine nerveuse par l'intermédiaire des branches gastriques du pneumogastrique, stimulation à laquelle les cellules principales sont plus sensibles que les cellules pariétales, et d'autre part, une stimulation d'origine hormonale par la gastrine sécrétée dans l'antre gastrique. Cette hormone possède une puissante activité sur les cellules pariétales et stimule à un niveau beaucoup moins élevé les cellules principales. Le mécanisme de sécrétion de la Gastrine est supposé en tous points comparable à d'autres mécanismes hormonaux ; en particulier la régulation de la sécrétion s'effectuerait selon le principe de Feed back. L'alcalinité et la distension de l'antre sont à l'origine de la sécrétion de l'hormone ; l'acide chlorhydrique produit sous sa stimulation inhibe sa libération lorsqu'il est en excès.

Il existe dans le domaine de la pathologie un exemple typique d'hyper-sécrétion gastrique où l'influence de la stimulation hormonale est très largement prédominante sur la stimulation nerveuse.

Il s'agit du syndrome de Zollinger-Ellison (3, 11) maladie ulcéreuse récidivante. La caractéristique physiopathologique fondamentale supposée de cette maladie résiderait dans le fait que le mécanisme de Feed back se trouverait incapable de fonctionner : les cellules pariétales produisent alors continuellement de l'acide chlorhydrique à des débits considérables, entraînant des ulcères à répétition. Le diagnostic de ce syndrome repose sur certains critères radiologiques et biologiques.

L'examen radiologique de l'estomac et de l'intestin grêle montre parfois une hypersécrétion de liquide, des ulcérations siégeant parfois sur l'oesophage, surtout sur le duodenum et le jéjunum, rarement sur l'estomac. Ces ulcérations peuvent être uniques ou multiples et s'accompagnent de modifications inflammatoires duodénales ou jéjunales.

La biologie repose d'une part, sur les résultats du tubage gastrique qui montre l'hypersécrétion acide et une corrélation acide pepsine basse (K 25) (9, 10, 32) et d'autre part, sur la mise en évidence dans les urines d'un pouvoir gastrosecrétagogue (test P.S.U.) (4, 7, 31), l'injection au rat des urines de sujets atteints de ce syndrome provoque une stimulation de la sécrétion acide gastrique de l'animal, alors que des urines de sujets témoins n'exercent aucun pouvoir de stimulation.

Le test P.S.U. est donc évocateur de la présence dans les urines de sujets atteints de ce syndrome de Zollinger-Ellison d'un métabolite d'origine hormonale et il est logique d'invoquer alors pour expliquer l'hyperfonctionnement des cellules pariétales une hyperproduction de gastrine. Les premières recherches destinées à isoler les substances gastrosecrétagogues urinaires ont débuté en 1963 en utilisant des méthodes classiques d'hormonologie.

Un bref résumé de l'histoire de la gastrine permettra de replacer le travail dans son contexte.

J.S. EDKINS en 1905 (14, 15) parle pour la première fois de Gastrine au cours de la lecture devant la Société Royale de Londres, d'un article portant sur le mécanisme chimique de la sécrétion gastrique "on the chemical mechanism of the gastric secretion". Il démontre qu'un extrait aqueux d'antré gastrique, injecté par voie veineuse chez le chat anesthésié exerce un pou-

voir stimulant de la sécrétion gastrique, tandis qu'un extrait aqueux de fundus est inactif.

Cette démonstration reste controversée ; nombre de physiologistes attribuent en fait le pouvoir stimulant à l'histamine qui existe dans la plupart des tissus.

Il faut attendre 1938 que S. KOMAROV (27) prépare un extrait antral duquel il isole une fraction protéique sans histamine et douée d'une puissante action stimulante pour que l'on admette la réalité de la gastrine en tant qu'hormone individualisée (28, 29).

En 1943, B. UVNAS (50) montre que l'excitation du nerf vague joue un rôle important dans la libération de l'hormone antrale.

En 1948, M.I. GROSSMAN (23) puis en 1963 L.R. DRAGSTEDT (13) confirment par des travaux de physiologie l'existence de l'hormone antrale et précisent son mécanisme d'action sur la sécrétion acide et peptique.

L'isolement et la caractérisation biochimique de l'hormone fait l'objet de nombreux travaux et en 1961 R.A. GREGORY (19) décrit une méthode de préparation et les propriétés d'un extrait gastrinique hautement purifié.

En 1964, R.A. GREGORY et H. TRACY (20) isolent les formes G I et G II de la gastrine à partir de l'antré de porc et précisent la constitution chimique de ces deux formes : il s'agit de deux heptadécapeptides de poids moléculaire de l'ordre de 2100. La différence entre ces deux formes réside dans le fait que G II possède un reste sulfate sur le résidu tyrosyl alors que le résidu tyrosyl de G I est libre. Cette même différence de structure

est retrouvée dans les formes de gastrine extraite chez l'homme et d'autres espèces animales. A partir de ces données, J.S. MORLEY (et Coll. I.C.I.) synthétise la Gastrine G I humaine (2, 39) étudie les relations structure-activité (40, 41,). Il aboutit à la synthèse de peptides de synthèse gastrinique (12, 42).

En 1964 également, TAUBER et MADISON (47) isolent une hormone d'un poids moléculaire plus élevé (12000) mais ce travail n'est pas assez convaincant et reste sans suite.

Etudiant la nature des facteurs gastrosecrétagogues de tumeurs pancréatiques de Zollinger-Ellison, R.A. GREGORY et H. TRACY (22) isolent G I et G II en 1969.

Depuis deux ans, les travaux de J. McGUIGAN et Coll. (24, 25, 26, 33, 34) et R. YALOW et S. BERSON (5, 6, 54) utilisent le dosage radioimmunologique de la gastrine et précisent le métabolisme de l'hormone.

Les travaux sur l'isolement des facteurs gastro-secrétagogues urinaires ont donc débuté alors que la nature de la gastrine n'était pas connue.

Il nous a paru indispensable, sitôt que nous avons eu connaissance des travaux de P.A. GREGORY de reproduire la méthode d'isolement et de purification qu'il préconisait et d'orienter notre travail concernant les facteurs gastrosecrétagogues urinaires en fonction de la Gastrine tant sur le plan technique que dans l'interprétation des résultats.

Il nous a semblé de plus en plus évident qu'au cours du syndrome de Zollinger-Ellison nous devions isoler ou ses métabolites, ou l'hormone antrale elle-même.

II - DESCRIPTION DES TECHNIQUES UTILISEES

A - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

1°- Chromatographie

- a) Sephadex
- b) Aminoethylcellulose
- c) Mise en évidence des fractions peptidiques

2°- Hydrolyse acide

3°- Analyse des acides aminés

- a) Principe
- b) Description de l'appareillage
- c) Mise en oeuvre
- d) Interprétation

B - TESTS BIOLOGIQUES

1°- Chez le rat

- a) Fistule transduodénogastrique
- b) Technique de Gosh-Lai

2°- Chez le Chien

- a) Fistule gastrique
- c) Poche de Heidenhain

3°- Prise d'essai.

II - DESCRIPTION DES TECHNIQUES UTILISEES

A - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

1°- METHODES DE CHROMATOGRAPHIES

Nous avons utilisé deux types de chromatographies selon les étapes de l'isolement et de la purification des produits à activité gastrinique.

Pour un fractionnement grossier nous nous adressons à une filtration moléculaire sur Gel de Sephadex. Pour séparer les produits de poids moléculaires voisins, nous avons choisi d'utiliser des résines échangeuses d'ions et en particulier une résine anionique, l'AminoÉthylcellulose.

a) Chromatographie sur Sephadex

1- Principe

Le Sephadex est un Dextran (16, 44) qui traité par l'épichlorhydrine en milieu alcalin forme un système réticulé présentant les propriétés d'un tamis moléculaire.

Le tamisage moléculaire est dû au fait que selon la taille des mailles, certaines molécules peuvent pénétrer à l'intérieur des billes de Sephadex alors que d'autres molécules de taille plus importante ne peuvent pénétrer et restent dans le liquide extérieur aux billes.

Dans la mesure où l'eau peut pénétrer dans les mailles, le produit sec, mis en présence d'une solution aqueuse, gonfle plus ou moins et prend l'aspect d'un gel. Plus le degré de réticulation du Sephadex est élevé,

moins l'eau pénètre dans les mailles et moins grande est la dilatation du grain. Les gels de Sephadex sont donc définis selon le poids d'eau nécessaire au gonflement c'est-à-dire en fonction inverse de leur réticulation.

Pour 10 grammes de poudre sèche, il faudra soit 25 grammes d'eau soit 50 grammes d'eau selon qu'il s'agit d'un Sephadex G 25 ou G 50.

Actuellement nous disposons de plusieurs types de Sephadex G₁₀, G₁₅, G₂₅, G₅₀, G₁₀₀, G₂₀₀, fournis par les laboratoires Pharmacia (Upsalla Suède).

Utilisés en chromatographie, ces gels créent deux zones de diffusions ; l'une est représentée par la solution dans les mailles de chaque grain et ne renferme que des molécules dont la taille est compatible avec la taille des mailles, et l'autre est constituée par le liquide circulant entre les grains, renfermant des substances de très faibles poids moléculaires ou de poids moléculaire élevé.

2- Gels utilisés

Nous avons utilisé essentiellement des gels finement réticulés : Sephadex G₅₀, G₂₅ et G₁₀.

La préparation de ces gels est pratiquement identique : il faut mettre le produit sec dans l'eau ou dans les solutions d'élution jusqu'à gonflement complet du gel : le temps requis est de l'ordre de 6 à 8 heures à la température du laboratoire.

Les caractéristiques des gels utilisés sont rassemblées dans le tableau suivant :

	Diamètre des particules μ	Quantité d'eau (ml) pour 1 gramme de Sephadex sec.	Pouvoir de rétention (poids moléculaire) pour :	
			Peptides et Proteines	Dextran
Sephadex G ₁₀	40 - 120	1,0 $\pm$ 0,1	700	700
Sephadex G ₂₅ Fine	20 - 80	2,5 $\pm$ 0,2	1.000 - 5.000	100 - 5.000
Sephadex G ₅₀ Fine	20 - 80	5,0 $\pm$ 0,3	1.500 - 30.000	500 - 10.000

3 - Montage de la colonne

100 cm de hauteur x 4 cm de diamètre

120 cm de hauteur x 2 cm de diamètre

100 cm de hauteur x 1 cm de diamètre

La colonne est remplie à mi-hauteur de liquide, eau ou solution d'élution, le bas de colonne étant fermé, le gel est ajouté jusqu'au sommet de la colonne et après que les grains aient commencé à sédimenter, le bas de colonne est ouvert. L'excès de liquide s'élimine et le gel est ajouté au fur et à mesure en petite quantité jusqu'au remplissage complet de la colonne afin d'éviter l'apparition de stries. Il serait préférable de monter les colonnes en laissant le gel arriver par aspiration, mais il faut alors disposer d'un système d'agitation pour éviter le colmatage des tubulures.

En plaçant le réservoir de liquide d'élution à un niveau à peine supérieur au sommet de la colonne, par simple écoulement pendant 24 heures, le gel subit un tassage régulier. Les chromatographies sont faites dans les mêmes conditions d'écoulement.

Nous vérifions la qualité du gel par filtration d'une molécule colorée de haut poids moléculaire, le bleu Dextran. Son élution doit être régulière et nous déterminons ainsi le volume mort de la colonne, puisque cette molécule, n'étant pas retenue, reste dans la phase interstitielle ; le volume nécessaire pour l'éluer correspond au volume de liquide entre les grains. Il est nécessaire de connaître la valeur de ce volume dit volume interstitiel pour déterminer les coefficients d'élution des substances retenues par le gel.

4 - Utilisation des colonnes.

Nous avons utilisé les Sephadex G₂₅ et G₅₀ pour séparer différentes protéines d'extraits biologiques. Nous utilisons une solution de bicarbonate d'ammonium 0,04 M comme solution d'élution.

Le mélange à chromatographier est déposé au sommet de la colonne sous un volume variable selon les dimensions des colonnes. Nous admettons que sur une colonne de 100 cm de hauteur de 4 cm de diamètre, il est possible de déposer au maximum 50 ml de solution d'extrait biologique et que sur une colonne de 120 cm de hauteur et de 2 cm de diamètre, il convient de ne pas dépasser 10 ml.

Le Sephadex G₁₀ (43) nous sert à séparer la Gastrine ou une substance Gastro-sécrétagogue purifiée des sels minéraux provenant des chromatographies précédentes. Le peptide est exclu alors que les sels sont retenus sur le gel. Le Sephadex G₁₀ après avoir gonflé dans de l'eau distillée est élué par ce même liquide.

b) Chromatographie sur Aminoéthylcellulose

1- Principe

L' aminoéthylcellulose est une résine anionique ; elle est donc capable de fixer des radicaux à charges électriques négatives. Cette propriété permettra donc d' isoler les 2 formes de la Gastrine, différentes par le nombre de charges électronégatives.

Pour détacher les protéines ainsi fixées par leurs charges électro-négatives dans des conditions de pH précises, il faut faire varier la concentration d'un anion qui soit capable de se fixer à la place des charges négatives des protéines. Au fur et à mesure que l'anion arrive sur la résine, les protéines sont éluées, ceci d'autant plus aisément que leur fixation est fragile (peu de charge négative). Pour des protéines très fortement fixées, il faut que cet élément d'échange soit introduit en proportion plus importante. Il est donc nécessaire d'utiliser un gradient de concentration ou de pH, ou des deux éléments à la fois, pour éluer une colonne de résine.

2 - Préparation de la résine

Nous préparons la résine de la façon suivante :

- la poudre est mise en contact avec HCl 0,5 N durant une demi-heure, puis la solution acide est ôtée et nous procédons au lavage de la résine avec de l'eau distillée. De nombreux lavages sont nécessaires jusqu'à ce que le pH de la résine soit proche de pH 5.

A ce stade nous mettons en contact la résine avec de la soude 0,5 N pendant une demi-heure. De nombreux lavages à l'eau distillée sont encore nécessaires pour amener la résine à un pH voisin de 8. Ensuite l'équilibre-

tion de la résine s'effectue par lavage dans une solution de bicarbonate d'ammonium 0,04 M à pH 7,8.

Cette solution doit être utilisée fraîchement préparée. La résine peut être conservée alors à + 4° en solution de bicarbonate d'ammonium sous une couche de toluène ; il est également possible de ne pas mettre de toluène comme protecteur, mais dans ce cas, il faut laver avec la solution à pH 7,8, la résine avant son utilisation.

Au cours des nombreux lavages, nous aspirons le liquide surmontant la résine, ce qui permet d'ôter les très petites particules restant en suspension, appelées "fines".

Il est possible pour accélérer les opérations, d'utiliser la filtration sur Büchner, mais dans ce cas les petites particules demeurent, diminuant le pouvoir de résolution de la résine.

Après chaque chromatographie, on peut réutiliser l'Aminoéthylcellulose à condition de lui faire subir ce traitement de lavage et de régénération.

3 - Montage des colonnes

Les colonnes utilisées sont de dimensions beaucoup plus restreintes que celles des colonnes de Sephadex.

Nous avons utilisé des colonnes de 60 cm de hauteur et de 1,2 cm de diamètre,	de 20 cm de hauteur et de 1,5 cm de diamètre,
de diamètre,	de 15 cm de hauteur et de 1,5 cm de diamètre.

La colonne est remplie à mi-hauteur de solution de bicarbonate d'ammonium 0,04 M, le bas de colonne étant fermé. Nous complétons par la suspension de résine à pH 7,8.

Après 10 minutes nous ouvrons le bas de colonne et nous remplaçons le liquide évacué par la suspension d'AminoEthylcellulose jusqu'à ce que la colonne soit complètement remplie.

A ce stade il convient à l'aide d'un bouchon ou d'une sorte de piston d'appuyer fortement sur la résine pour qu'elle soit bien tassée, puis de la faire couler uniquement en solution de bicarbonate d'ammonium 0,04 M.

4- Mise en oeuvre

Le prélèvement à chromatographier doit être en solution à pH 7,8 dans un petit volume, de l'ordre de 0,5 ml. Il est placé directement sur la résine, au sein de laquelle il pénètre. Il faut recouvrir ensuite le sommet par un à deux millilitre de solution de bicarbonate d'ammonium 0,04 M. La chromatographie peut alors commencer.

Nous la pratiquons en deux temps :

1/ Tout d'abord nous n'admettons comme éluant que la solution à 0,04 M durant 2 à 3 heures selon les colonnes utilisées.

2/ Puis nous branchons le gradient de concentration en bicarbonate d'ammonium.

Pour faire un gradient régulier, nous utilisons une pompe proportionnante TECHNICON. Deux tubes de pompes du même diamètre interne (de débit soit 0,10 ml/min., soit 0,32 ml/min.) sont placés sur le plateau de la pompe ;

l'un des tubes aspire la solution de bicarbonate d'ammonium d'un réservoir équipé d'une agitation magnétique et pulse ce liquide vers le sommet de la colonne. La quantité de solution de bicarbonate d'ammonium dans le réservoir est de 100 ml. L'autre tube aspire une solution de ce même sel à 0,4 M et le dirige vers le réservoir. L'agitation permet d'avoir un mélange homogène des solutions.

L'évolution du gradient est mis en évidence par le dosage automatique sur Autoanalyseur Technicon de l'ion ammonium à la sortie de la colonne, selon la méthode de Berthelot.

Le Manifold est représenté dans le schéma 1 et les réactifs sont décrits dans le tableau n° I.

La forme du gradient est une exponentielle.

c) Mise en évidence des fractions peptidiques à partir de chromatographies

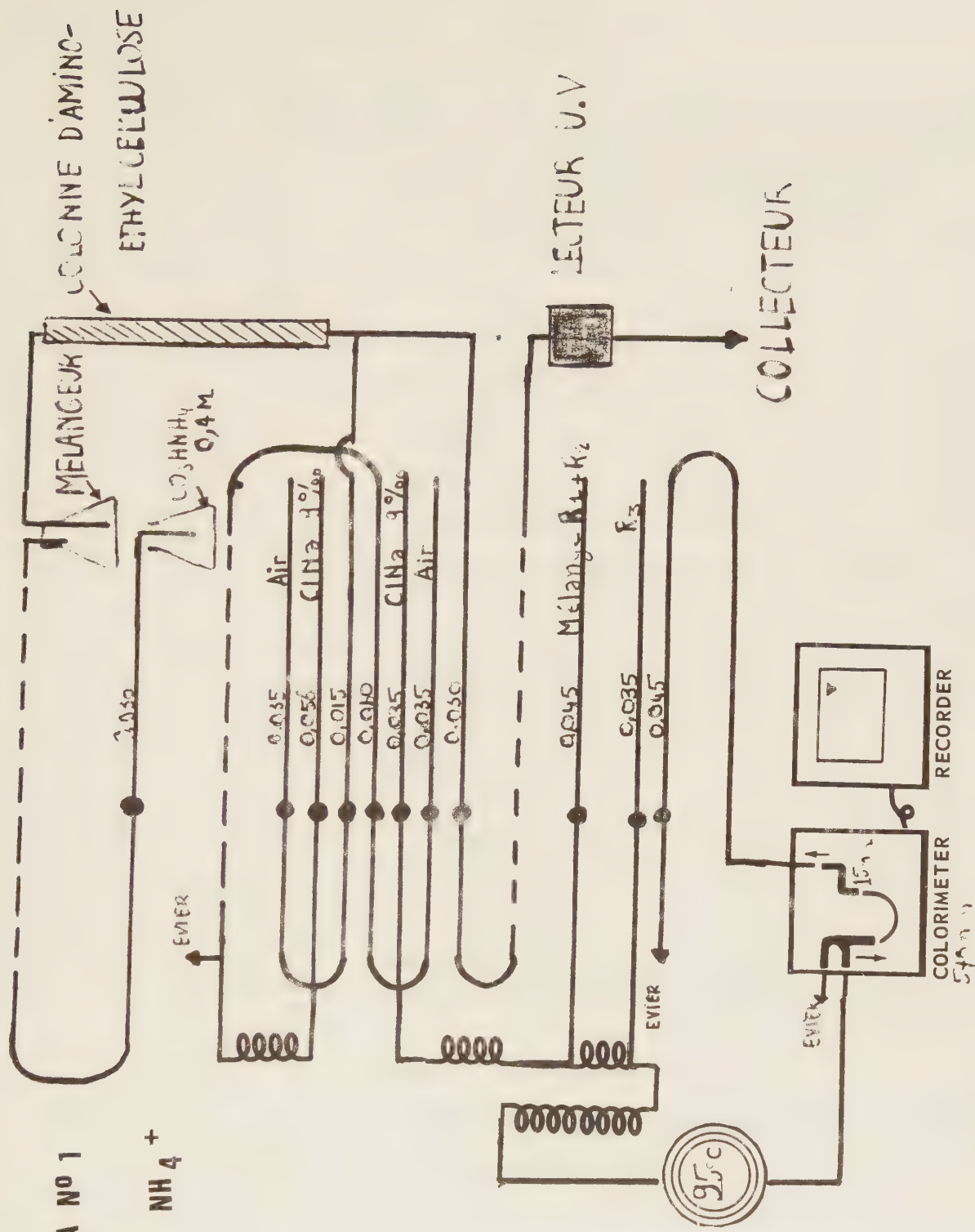
L'éluat issu des chromatographies sur Sephadex ou sur Amino-éthyl-cellulose est fractionné et réparti à l'aide de collecteurs de fractions. Le fractionnement est effectué soit en déterminant un nombre de gouttes devant une cellule photoélectrique, soit en fonction du temps, soit enfin à l'aide de syphons de volume déterminé.

Selon les supports de chromatographie, et la taille de colonne nous avons réparti en fractions variant entre 10 ml et 1,8 ml.

Chaque fraction est lue au spectrophotomètre à 2 longueurs d'onde : nous lisons l'absorption à 230 nm proportionnelle au nombre de liaisons peptidiques et à 278 nm caractéristique de la présence d'acides aminés aromatiques.

SCHEMA NO 1

DOSAGE DE L'ION NH_4^+



MONTAGE UTILISE POUR MESURER L'EVOLUTION DU GRADIENT AU COURS
DES CHROMATOGRAPHIES SUR AMINOETHYLCELLULOSE

TABLEAU I

DOSAGE AUTOMATIQUE DE L'ION AMMONIUM POUR L'ETUDE DU GRADIENT
DE CONCENTRATION EN BICARBONATE D'AMMONIUM AU COURS DE
L'ELUTION DE COLONNE D'AMINOETHYLCELLULOSE.

REACTIFS

R. 1 Réactif Phénol sodique

Phénol 25 gr.
NaOH 0,1 gr.
Eau bidistillée qsp 1000 ml

Conservation excellente en flacon coloré .

R. 2 Réactif au Nitroprussiate de Sodium.

Réactif de Legal à diluer au 1/200. La conservation de la solution fille est de une semaine.

R. 3 Solution Tampon

Phosphate dissodique 12 H₂O 180 gr.
Soude pure en pastille 6 gr.
Eau bidistillée qsp 1000 ml.

Après dissolution (agitation magnétique) addition de 12 ml. de solution d'hypochlorite du commerce à 50 °.

R. 4 Solution d'étalonnage

Solution initiale. CO₃HNH₄ 0,4 M (31,6 gr./litre)
Dilution : 3/4 , 1/2 , 1/4 , 1/10

Nous traçons ensuite un chromatogramme double, qui permet de mettre en évidence des fractions peptidiques séparées les unes des autres sous la forme de pics.

L'éluat est alors rassemblé en fonction des pics ainsi déterminés. Le peptide ou les groupes de peptides sont en solution aqueuse et nous les deshydratons le plus vite possible dans un but de protection et dans un but de concentration. Nous utilisons selon les volumes à traiter et selon les stades de purification soit la lyophilisation, soit la dessiccation sous vide.

2°- TECHNIQUE D'HYDROLYSE

Les produits isolés purs sont soumis à l'analyse de leur constitution élémentaire en aminoacides. Il est donc nécessaire d'en pratiquer l'hydrolyse. Nous avons choisi l'hydrolyse acide qui est assez simple à réaliser ; elle présente cependant l'inconvénient de détruire le tryptophane ce qui nous a obligé à ne caractériser cet acide aminé que par la réaction d'Ehrlich.

La prise d'essai de substance est de l'ordre de 500 μg pour la Gastrine. Par contre, en raison de la petite quantité de produits gastro-sécrétagogues extraites des urines, les prises d'essai sont beaucoup plus faibles.

La substance est dissoute dans un volume d'eau distillée de 0,3 ml environ et la solution placée dans un tube de verre fermé à la partie inférieure.

Nous ajoutons : 1 ml d'HCl 5,6 N

0,1 ml de solution de Norleucine à 2,5 $\mu\text{mole/ml}$

1 goutte de Phénol à 5 %.

Le tube de verre est alors plongé dans un mélange d'alcool et de carboglace jusqu'à congélation complète.

A l'aide d'une pompe à vide nous créons un vide assez poussé dans le tube que nous scellons à l'aide d'un chalumeau. L'hydrolyse est conduite pendant 24, 48 ou 72 heures dans une étuve à 110° C.

3°- ANALYSE DES ACIDES AMINES

Cette analyse est pratiquée à l'aide d'un Autoanalyseur TECHNICON.

a) Principe

Une résine cationique "chromobeads" de haute résolution placée dans une colonne maintenue à température constante, fixe les acides aminés d'un hydrolysats. L'élution de ceux-ci s'effectue, selon le principe de MOORE et STEIN (37, 38, 46), par d'admission sur la colonne de tampons citrate de pH et de molarité en Na^+ croissants. Les acides aminés acides dont le degré de fixation sur la résine est faible sont élués en premier, puis les aminoacides neutres et enfin les aminoacides basiques, les mieux fixés sur la résine.

La mise en évidence de chaque acide aminé dans l'éluat s'effectue par la mesure en flux continu de la coloration obtenue avec la ninhydrine par un système de 3 colorimètres reliés à un enregistreur 3 points, traçant le chromatogramme. En rapportant à des solutions standard d'acide amino les coefficients d'élution de chaque pic ainsi que leur surface on détermine la nature et la quantité de chaque acide aminé.

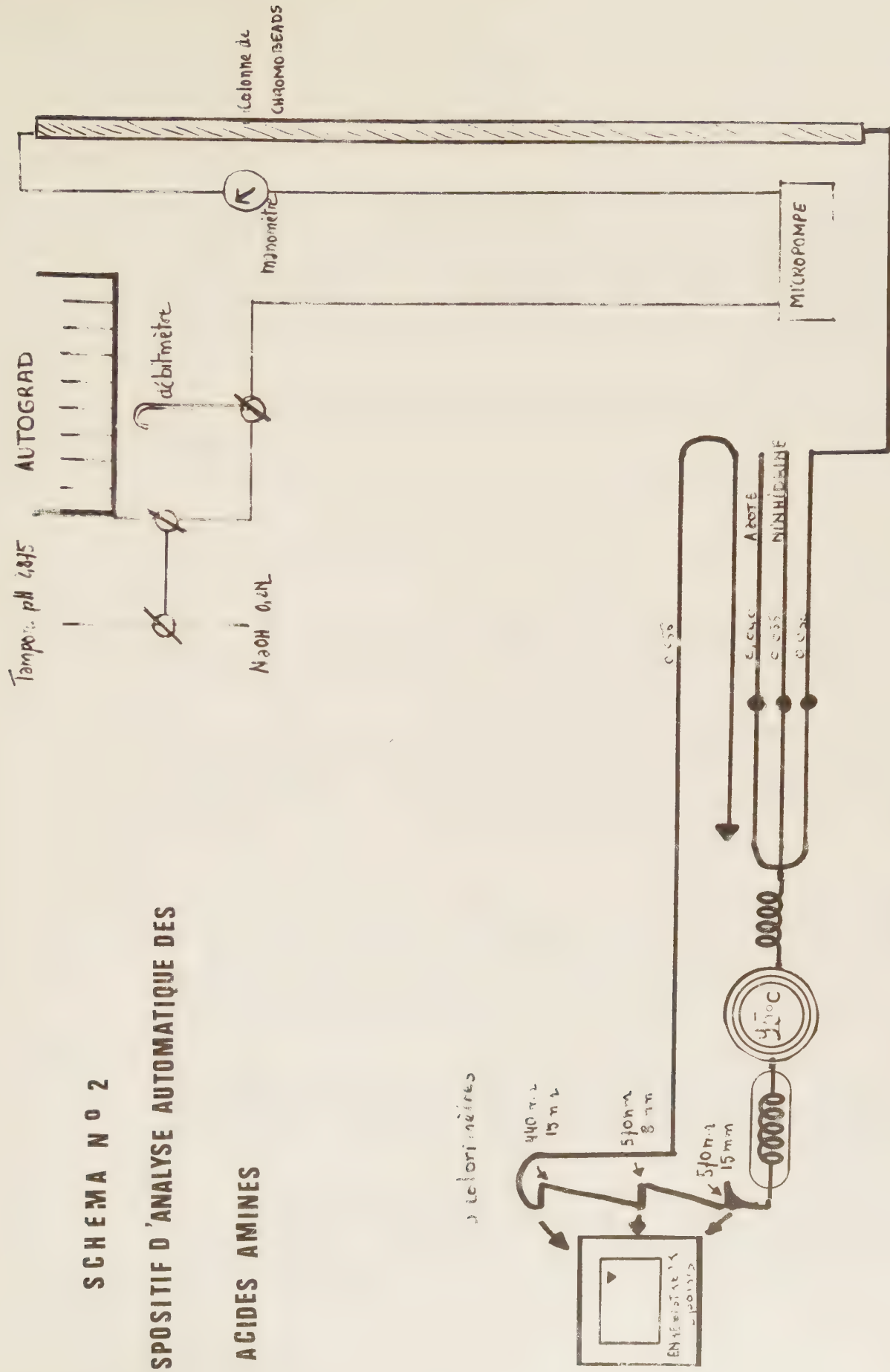
b) Description de l'appareillage (schéma n° 2)

1- Dispositif chromatographique permettant la séparation des acides aminés.

SCHEMA N° 2

DISPOSITIF D'ANALYSE AUTOMATIQUE DES

ACIDES AMINES



* La résine : Il s'agit d'une résine cationique. L'acide sulfonique, groupement actif, est fixé sur une trame constituée par la condensation de molécules de styrène et de divinylbenzène. La quantité de divinyl benzène introduit permet de connaître le taux de réticulation de la résine.

Les dimensions des sphères sont à la base de la classification des résines.

Chromobaeds : A : 21 μ
 B : 17 μ
 C₂ : 13 μ

La granulation est de qualité remarquable puisque l'écart type est de $\pm 1 \mu$. A chaque type de granulation correspondent des analyses différentes.

Nous avons utilisé la résine Chromobaeds A dont le taux de divinylbenzène est de 8 % et dont les sphères ont un diamètre de 21 μ , pour l'étude d'hydrolysats. Cette résine doit être régénérée par de la soude puis équilibrée par le tampon de départ de la chromatographie.

** La colonne : La résine Chromobaeds A est placée dans une colonne de 140 cm de hauteur et de 0,635 cm de diamètre. Cette colonne est entourée d'une jaquette permettant la circulation d'eau maintenue constamment à 60° grâce à un bain-marie muni d'une pompe.

*** Alimentation de la colonne : Un système de robinet à 3 voies permet d'admettre sur la colonne différents réactifs selon les stades de la manipulation.

La régénération de la résine nécessite le passage de soude à 0,2 N ; son équilibration, un tampon de pH 2,875 et enfin la chromatographie proprement dite utilise un mélange de tampons issu d'un Autograd.

L'Autograd est un ensemble de 9 chambres reliées les unes aux autres par des robinets. Dans ces chambres sont placés les différents tampons dans des rapports précis. Un agitateur brasse en permanence des liquide et homogénise le mélange des tampons.

Tous les liquides sont aspirés et admis sous pression sur le haut de colonne grâce à une micropompe. Un manomètre placé entre cette micro pompe et le haut de colonne permet de vérifier la pression exercée sur la colonne.

2- Système analytique destiné à caractériser et à doser les acides aminés.

L'analyse des acides aminés est pratiqués en flux continu à partir de l'éluat issu de la colonne. Une solution de ninhydrine, réactif colorant des acides aminés, est aspiré constamment grâce à une pompe proportionnante ; le flux continu de ce réactif reçoit l'éluat issu de la colonne de chromatographie et les phases liquides sont segmentées par de l'azote.

Le mélange entre les phases liquides est réalisé dans des bobines dites "de mélange". Le circuit passe dans un bain-marie à 95°, ce qui accélère le développement de la coloration.

Le flux, après refroidissement dans une bobine sous jaquette dans laquelle circule de l'eau froide arrive aux colorimètres. Ceux-ci sont disposés en série, le premier colorimètre est réglé à 570 nm et sa cuve de lecture mesure 15 mm. Il est destiné à mesurer la coloration violette, formée par la plupart des acides aminés avec la ninhydrine.

Un second colorimètre mesure l'absorption à la même longueur d'onde mais la cuve de lecture n'étant que de 8 mm l'absorption mesurée sera environ deux fois moins importante. Ceci permet une lecture même si l'intensité

de la coloration a dépassé les capacités de lecture de la cuve de 15 mm du premier colorimètre. Enfin, certains acides aminés, proline, hydroxyproline, ne se colorent pas en violet mais en jaune avec la ninhydrine, il est nécessaire d'ajouter un troisième colorimètre mesurant avec une cuve de 15 mm, l'absorption à 440 nm.

Les trois colorimètres sont reliés à un enregistreur qui à intervalles de temps réguliers, inscrit par des points la mesure de chaque colorimètre. Chaque canal est représenté par une couleur différente ce qui facilite la lecture.

c) Mise en oeuvre

1- Réactifs

R₁ : Solution de soude 2 N

R₂ : Solution de soude 0,2 N

R₃ : Méthylcellosolve pur. Il doit être exempt de peroxydes et parfaitement clair.

R₄ : Solution de méthylcellosolve à 50 % : R₃ : 1 litre

Eau distillée : 1 litre

à préparer 24 heures à l'avance.

R₅ : Tampon pH 5,5

Acétate de sodium 1640 grammes

Acide acétique glacial 500 ml

Eau distillée qsp 5000 ml

La solution doit être à pH 5,51 $\pm$ 0.03

R₆ : Réactif à la ninhydrine solution stock.

Ninhydrine 20 g

Hydrindantine 1,5 g

R₃ 650 ml

R₅ 350 ml

La dissolution de la ninhydrine et de l'hydrindantine dans R_3 doit être complète avant l'addition de R_5 .

Le réactif est conservé dans un flacon de verre teinté et il faut faire barboter de l'azote à travers la solution au moment de la préparation et de l'utilisation.

A préparer 24 heures avant l'utilisation.

R_7 : Réactif à la ninhydrine/ Solution de travail.

R_6 300 ml

R_4 1200 ml

Faire barboter de l'azote 15 minutes après le mélange des deux réactifs.

R_8 : Solution d'acide chlorhydrique 6 N

R_9 : Tampon pH 2,875

Citrate trisodique 2 H_2O : 14,71 g

Eau distillée : 900 ml

R_1 : 25 ml

Thiodiglycol : 5 ml

Solution de Brig 35 : 10 ml

Ajuster à pH 2,875 avec R_8 ; compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.
Ajuster définitivement le pH.

R_{10} : Tampon à pH 3,80

Citrate trisodique 2 H_2O : 14,71 g

Eau distillée : 900 ml

R_1 : 25 ml

Thiodiglycol : 5 ml

Sol. de Brig 35 : 10 ml

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée. Ajuster définitivement le pH.

R₁₁ : Tampon à pH 5,00

Citrate trisodique 2 H₂O : 14,71 g

Eau distillée : 900 ml

R₁ : 25 ml

Chlorure de sodium : 37,07 g

Sol. de Brig. 35 : 10 ml

Ajuster à pH 5,00 avec R₈

Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée.

Ajuster définitivement le pH.

2- Préparation de la Résine.

La résine est d'abord régénérée par passage de R₂ durant 30 minutes. Puis on admet le tampon d'équilibration R₉ durant une heure et demie. La micropompe est réglée pour que le débit de la colonne soit de 0,5 ml/mm. La colonne est alors prête pour une chromatographie.

3- Préparation de l'Autograd.

La répartition des réactifs dans les 9 chambres s'effectue selon l'ordre suivant :

Chambre

1	70 ml R ₉	+	5 ml méthanol	
2	73 ml R ₉	+	2 ml méthanol	
3	75 ml R ₉			
4	75 ml R ₉			
5	70 ml R ₁₀	+	5 ml R ₁₁	
6	6 ml R ₉	+	9 ml R ₁₀	+ 60 ml R ₁₁
7	75 ml R ₁₁			
8	75 ml R ₁₁			
9	75 ml R ₁₁			

4- Mise en place de l'échantillon à analyser

La micro pompe étant arrêtée, il faut retirer le haut de colonne, aspirer le tampon qui se trouve au dessus de la résine. Le prélèvement dissout dans 0,1 ml de tampon R_9 est déposé sur la résine. En poussant de l'air avec une seringue, la surpression créée sur le haut de colonne fait pénétrer le prélèvement dans la résine. Un rinçage des parois de la colonne est pratiqué avec du tampon R_9 . Une nouvelle surpression fait pénétrer ce liquide.

Ensuite la résine est recouverte de tampon R_9 jusqu'au ^{sommet} ~~moment~~ de la colonne et le haut de colonne est fixé avec des pinces. Il faut veiller à ne pas introduire de bulles d'air. L'alimentation de la colonne est branchée sur l'Autograd et la chromatographie commence avec la mise en route de la micropompe. Elle dure environ 19 heures.

5- Fonctionnement du système analytique

Le système analytique est rincé par passage de R_4 . Puis avant la mise en route de la chromatographie, R_7 est branché de façon à pratiquer un étalonnage externe avec une solution de Norleucine, ce qui permet d'évaluer le pouvoir de coloration de la solution de ninhydrine du jour de l'analyse. Au départ de la chromatographie, le catheter sortant du bas de la colonne est relié au système analytique et l'enregistrement est alors au point 0.

d) Interprétation

Il faut s'assurer de la bonne marche de l'appareillage avant toute analyse par l'étude d'un mélange standard d'acides aminés dont la concentration est connue. Nous plaçons sur la colonne 0,1 ml de ce mélange à 2,5 μ moles de

chaque acide aminé par millilitre auquel nous ajoutons à titre d'étalon interne 0,1 ml d'une solution de Norleucine à 2,5 μ mole par millilitre.

L'obtention d'un chromatogramme correct est une garantie du bon fonctionnement et de la qualité du tampon R_9 , R_{10} et R_{11} . Ce chromatogramme permet en outre :

1/ de calculer le coefficient d'élution de chaque acide aminé ou Rf

$$Rf = \frac{\text{distance du maximum du pic de l'acide aminé envisagé}}{\text{maximum du pic de Norleucine}}$$

2/ de calculer la surface du pic pour une prise d'essai de 0,250 μ mole.

La surface est obtenue en multipliant la hauteur du pic en densité optique par la largeur en millimètre à sa demi hauteur.

Soit D la densité optique (DO) du pic par rapport au zéro de DO et d la densité optique de la ligne de base par rapport à zéro de DO la hauteur réelle du pic est : $D - d$

la demi-hauteur est alors : $\frac{D - d}{2} + d$

Les mêmes déterminations sont pratiquées sur le chromatogramme obtenu à partir d'un hydrolysats.

1/ le Rf identifiant les acides aminés

2/ le rapport des surfaces permettant le calcul en μ mole de la quantité de chaque acide aminé. Pour ce calcul quelques corrections sont à apporter dépendant de l'intensité de coloration de la ninhydrine mesurée par l'étalonnage externe à la Norleucine.

La formule appliquée est la suivante :

$$\mu\text{mole} = 0,250 \times \frac{S \text{ Hydrolysats}}{S \text{ standard}} \times \frac{DO \text{ norleucine ext. Standard}}{DO \text{ norleucine ext. hydrolysats}} \times \frac{S. \text{ norleucine int. Stand.}}{S. \text{ norleucine int. hydrolysats}}$$

où S représente la surface des pics et DO la densité optique.

B - TESTS BIOLOGIQUES

Etant donné la variété des substances peptidiques extraites de milieux biologiques, notre travail ne peut être orienté que si des tests biologiques nous permettent de sélectionner les fractions possédant une activité sur la sécrétion gastrique.

Nous avons disposé de tests à la fois sur le rat et sur le chien.

1°- TESTS CHEZ LE RAT

Deux types de tests différents sur cet animal ont été employés.

a) Fistule transduodénogastrique (8)

Sur l'animal anesthésié, on place une petite canule à travers le duodénum. L'animal éveillé est ensuite immobilisé dans un grillage au travers duquel sort la canule.

On recueille la sécrétion gastrique spontanée de l'animal durant 3 heures, sur laquelle on mesure le volume, l'acidité et on calcule le débit de la sécrétion acide.

A la 3ème heure on injecte par voie veineuse le produit à tester et on recueille la nouvelle sécrétion pendant les 3 heures suivantes. Les mêmes paramètres sont mesurés. La comparaison des résultats tant en volume en concentration acide, qu'en débit, porte sur les 3 heures après stimulation par rapport aux 3 heures de sécrétion spontanée.

L'activité d'une substance ne peut être affirmée que s'il y a une élévation de l'un ou de plusieurs paramètres chez 5 animaux ayant reçu la même substance à tester.

Ce test qui sert à apprécier l'activité gastrosecrétagogue des urines est dit test P.S.U. (31) (Pouvoir secrétagogue urinaire) et sert de diagnostic des syndromes d'hypergastrinémie.

b) Technique de GOSH-LAT (30)

Elle présente l'avantage d'être plus rapide et de traiter plus d'échantillons que la fistule transduodénogastrique sur un même nombre d'animaux.

Elle se pratique sur le rat anesthésié à l'uréthane. Un cathéter passant par l'oesophage irrigue l'estomac avec une solution isotonique de ClNa. Un second cathéter installé au niveau du pylore évacue le liquide de perfusion de l'estomac.

Le débit de perfusion est fixé à 1 ml/min et le recueil du liquide s'effectue à intervalle de temps régulier (10 minutes).

Sur chaque fraction de soluté isotonique de ClNa de 10 minutes on titre à l'aide d'une solution de soude N/200 l'acidité exprimée en micro-Equivalent d'acide.

On peut déterminer ainsi la sécrétion basale de l'animal, puis en injectant par voie veineuse un produit gastrinique (pentapeptide I.C.I. 50.123) étalonner la sécrétion. Après 1 heure et demie, lorsque la sécrétion est revenue à son taux basal, on injecte la substance à tester. On note alors les variations éventuelles de la sécrétion acide et le délai d'apparition du maximum de la sécrétion.

Le résultat est exprimé par le facteur de multiplication de la sécrétion de base : $B \times \text{facteur de multiplication}$.

2°- TESTS CHEZ LE CHIEN

Nous avons disposé de deux types de préparation sur le chien. Les mesures pratiquées sur le suc gastrique recueilli comportent :

- détermination de l'acidité par titrimétrie. Nous utilisons deux indicateurs de virage pour mettre en évidence :

. A.L. acidité libre (virage du R. de Töpfer à pH 3,5)

. A.T. acidité totale (virage de la phénolphthaléine à pH 8,5)

- le dosage de l'activité protéolytique sur Autoanalyseur TECHNICON (52)

a) Fistule gastrique simple

Sur des chiens munis d'une fistule gastrique simple, dont on a au préalable déterminé la sensibilité quant à la sécrétion gastrique par l'établissement d'une courbe dose-réponse avec le pentapeptide gastrinique I.C.I. 50.123.

Nous avons pratiqué l'injection des produits à tester par voie veineuse en perfusion lente en ce qui concerne les extraits urinaires, en injections uniques par voie sous cutanée pour les préparations gastriniques.

Le chien n'a pas en principe de sécrétion basale, mais de nombreux stimuli extérieurs peuvent provoquer une sécrétion : aussi est-il nécessaire de vérifier avant tout test l'absence de sécrétion spontanée sur ce montage à vague intact. Si l'animal n'a aucune sécrétion basale on peut alors pratiquer le test.

Pour mettre en évidence la réponse sécrétoire gastrinique à partir d'une faible quantité de produit injecté, il est nécessaire d'adjoindre l'injection à doses subliminaires de cholinergiques.

b) Poche de Heidenhain (35)

La poche de Heidenhain est une poche antrale dénervée munie d'une canule permettant le recueil de la sécrétion. Les stimuli extérieurs n'influencent pas la sécrétion qui est seulement soumise à l'action d'un produit hormonal.

L'injection de la substance à tester se pratique de la même façon que pour la fistule gastrique simple. Cependant, là encore pour sensibiliser la réponse, une injection à des doses subliminaires d'un cholinergique peut être nécessaire.

3°- PRISE D'ESSAI DE SUBSTANCE INJECTÉE

Lorsque débute l'isolement de substance à effet gastrosecrétagogue à partir des milieux biologiques, il n'est pas possible d'établir une correspondance pondérale en produit purifié. Nous avons donc établi des équivalences en matériel biologique de départ, en prenant comme unité, soit l'ancre, soit dans le cas d'urine, le millilitre.

Au stade d'isolement par chromatographie nous avons admis pour l'étude des fractions isolées que chaque fraction est à elle seule responsable de toute l'activité. Si à partir d'un litre d'urine, nous obtenons après Séphadex une fraction de 50 ml, nous admettons pour le test que ce volume de 50 ml supporte toute l'activité du litre d'urine et nous calculons la quantité de cette fraction à injecter par rapport à la quantité d'urine d'origine ayant donné une réponse biologique positive.

Pour les produits purifiés, nous pouvons utiliser une correspondance pondérale comme dans le cas de la Gastrine Antrale. Mais à partir des urines la faible quantité de substance isolée nous contraint à conserver l'équivalence en volume.

III - ISOLEMENT DE LA GASTRINE ANTRALE DU PORC

A - MODALITES D'EXTRACTION ET D'ISOLEMENT

1°- Extraction

2°- Concentration

3°- Isolement et purification

B - RESULTATS

1°- Résultats biochimiques

a) Electrophorèse

b) Analyse élémentaire des acides aminés

2°- Résultats biologiques

a) Contrôles de la préparation chez le rat

b) Courbe dose-réponse avec G I chez le rat

c) Résultats chez le chien aux différents stades de la préparation.

III - ISOLEMENT DE GASTRINE ANTRALE DE PORC

L'isolement de l'hormone antrale avait été tenté par de nombreux auteurs qui souvent se limitaient à obtenir un extrait plus ou moins pur pour des expérimentations de physiologie.

En 1964, TAUBER et MADISON (47) publient une technique d'isolement d'une hormone extraite de l'antré d'un poids moléculaire de 12.000. Leur travail surtout biochimique n'est pas suffisamment convaincant pour prouver sur le plan biologique qu'il s'agit de la Gastrine. La même année, R.A. GREGORY et H. TRACY (20, 48) s'imposent avec autorité en décrivant les deux formes G I et G II de l'hormone antrale du porc et la méthode d'isolement et de purification des heptadecapeptides.

Nous avons débuté notre travail en essayant de reproduire cette méthode. Nous avons eu le plaisir de rencontrer le professeur R.A. GREGORY et M.H. TRACY à Liverpool qui ont la gentillesse de nous conseiller et de nous montrer certains points techniques. Notre travail a alors progressé et nous avons pu leur montrer nos résultats deux années plus tard.

A - MODALITES D'EXTRACTION ET D'ISOLEMENT DE LA GASTRINE

Pour isoler une quantité appréciable d'hormone, nous avons travaillé sur des lots de 300 antres de porc ce qui pour un laboratoire pose d'énormes problèmes matériels et techniques.

Nous avons reçu l'aide technique très précieuse des laboratoires EURORGA qui ont mis à notre disposition leur matériel et qui nous ont largement aidé.

Plusieurs stades doivent être envisagés depuis la réception des antres jusqu'à l'isolement complet de l'hormone, nous décrivons donc :

1°- L'extraction

2°- La concentration de l'extrait antral

3°- L'isolement et la purification de l'hormone

1°- EXTRACTION

Aussitôt après l'abattage des porcs, les antres sont isolés et parés, ils subissent un brossage énergique sous courant d'eau froide pour ôter le mucus superficiel.

Ils sont ensuite plongés dans de l'eau bouillante. L'eau utilisée est de l'eau du robinet, dont le pH doit être aux environs de pH 7, ce qui est obtenu par addition d'ammoniaque si cela est nécessaire. La quantité d'eau est calculée sur la base de 0,5 litre par antre. L'ébullition doit être poursuivie durant 30 minutes.

Le bouillon doit refroidir le plus rapidement possible, soit à l'aide d'un système de circulation d'eau froide, soit en le plaçant dans une enceinte à + 4°. Après refroidissement complet, la couche de graisse qui s'est solidifiée est écumée et la solution filtrée sur un papier filtre épais. Cette opération est assez longue et se pratique dans une chambre froide à +4°.

Le filtrat est amené à pH 7,8 par de l'ammoniaque et les protéines et les peptides sont fixés sur de la DiEthylAminoEthylCellulose en floc (DE 50 Whatmann) par addition de 150 grammes de résine. Une agitation vigoureuse est nécessaire durant 3 heures.

Le mélange est alors filtré sur une étamine de nylon qui retient le floc. L'activité biologique mesurée sur le liquide filtré doit être nulle ; conservé à -20° , le floc ne subit pas d'altération notable au moins sur des périodes de temps n'excédant pas 6 mois, mais nous pensons qu'il est préférable de la traiter le plus rapidement possible.

L'élution des protéines et des peptides fixés sur l'Aminoéthylcellulose s'effectue à l'aide de soude 0,1 N. Pour 150 grammes de résine, nous pratiquons deux extractions avec chaque fois 1 litre de soude et nous laissons en contact quinze minutes environ. Le floc ainsi traité est séparé de la solution alcaline par filtration sur étamine de nylon et exprimé par pression sur la résine pour récupérer le volume maximum.

La solution protéique alcaline est amenée à pH 4 très progressivement par l'addition d'acide acétique glacial et pendant cette opération, il faut mettre en oeuvre une agitation assez vive et contrôler l'évolution du pH sur un pHmètre. Il se forme un précipité dès que l'on atteint pH 6 qui devient de plus en plus important jusqu'à pH 4.

Nous laissons en contact la solution à pH 4 et le précipité toute une nuit au réfrigérateur : la précipitation se poursuit en effet dans ces conditions.

Nous centrifugeons et recueillons le précipité qui peut éventuellement être conservé à -20° .

...

2°- CONCENTRATION DE L'EXTRAIT ANTRAL

Le précipité est dissout dans 300 ml d'eau dont le pH est amené à 10 par addition de quelques gouttes d'ammoniaque pur. Le pouvoir tampon des protéines nécessite un réajustement permanent du pH à 10 par l'ammoniaque.

Quand la dissolution du précipité est complète, nous ajoutons 150 grammes de phosphate dipotassique. Le mélange est placé dans un récipient rempli d'eau et de glace pour éviter l'échauffement lors de la dissolution du phosphate. En maintenant une agitation vigoureuse, on ajoute de l'alcool isopropylique à raison de 0,8 volume (soit pour 300 antres : 240 ml) et on laisse le mélange en contact durant 30 minutes. Il est important d'additionner lentement l'alcool isopropylique et d'exercer une agitation aussi vive que possible.

On centrifuge ensuite le liquide durant 15 minutes à 1200 tours/minute. Après centrifugation, on observe une phase supérieure claire et colorée en vert pale : phase isopropylique ; une phase inférieure très pigmentée et entre ces deux phases, un anneau solide brun.

On recueille la phase isopropylique et ajoute les deux autres phases à 300 ml d'eau distillée à pH 10 dans laquelle est dissout 150 g de phosphate dipotassique. On recommence une extraction par l'alcool isopropylique et on pratique une nouvelle centrifugation. La nouvelle phase isopropylique est recueillie et est jointe à la première ; la phase organique est rassemblée dans une ampoule à décanter. On ajoute un volume d'éther éthylique dans le rapport de 2 à 3 fois le volume d'alcool isopropylique et 10 ml d'eau distillée. On agite violemment le mélange pendant 2 à 3 minutes. La phase aqueuse pigmentée descend dans le col de l'ampoule et est récupérée facilement.

Une nouvelle addition de 10 ml permet dans les mêmes conditions de récupérer une phase aqueuse chargée en gastrine.

Après évaporation de l'éther sous vide, la phase aqueuse est précipitée à pH 4 par l'acide acétique glacial. Cette précipitation doit être effectuée très lentement et sous le contrôle d'un pHmètre.

3°- ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'HORMONE

Le précipité obtenu à la dernière phase de la concentration de l'hormone est mis en solution dans quelques gouttes d'ammoniaque pure et la solution obtenue est déposée sur une colonne de Sephadex G 50. Le choix de ce gel réside dans le fait que la gastrine se trouve mélangée à de nombreuses substances peptidiques desquelles il faut l'isoler au mieux. D'autre part, sur Sephadex G 25 le pic de gastrine est élué dans une zone où sont également élués les sels. Sur Sephadex G 50, on observe un premier pic très important décroissant lentement puis le pic de la Gastrine et enfin souvent un dernier pic, où se trouvent sels et petits peptides.

La détermination de l'activité biologique indique que seule la fraction médiane est gastrosecrétagogue.

A ce stade nous desséchons le produit isolé sous vide en prenant la précaution de provoquer un vide progressif, jusqu'à congélation de la solution. Après quelques heures, la dessiccation est complète.

La dissolution du produit sec obtenu est aisément obtenue par quelques gouttes de bicarbonate d'ammonium 0,04 M et la solution est déposée sur une colonne d'Aminoéthylcellulose pour séparer les formes G I et G II.

Le chromatogramme montre deux pics bien séparés, représentant respectivement les Gastrines G I et G II. La concentration en bicarbonate pour éluer G I est de 0,250 M et pour G II 0,275 M.

Chaque fraction gastrinique est desséchée sous vide et purifiée par un nouveau traitement sur Aminoéthylcellulose.

Pour achever la purification, une filtration sur Sephadex G 10 élimine les sels, des solutions de Gastrine G I et de Gastrine G II et permet d'obtenir des peptides purs.

B - RESULTATS

Nous envisagerons les résultats de l'isolement et de la purification de l'hormone antrale sous deux rubriques : la caractérisation de l'hormone sous l'angle biochimique et l'étude de l'action biologique sur l'animal.

1°- RESULTATS BIOCHIMIQUES

a) La détermination du degré de pureté des peptides isolés est réalisée par l'étude électrophorétique des deux formes G I et G II qui apporte la preuve de la charge électronégative supplémentaire due au radical SO_3H fixé au résidu tyrosyl de G II.

L'électrophorèse sur papier pratiquée à pH 9 en tampon borate montre que les deux peptides migrent vers l'anode mais G II migre en avant de G I. La révélation est réalisée par la chloriminoréaction ; en effet, les colorations à l'Amino Schwart ou à la Ninhydrine ne peuvent être utilisées pour de tels peptides.

b) Les deux formes G I et G II sont donc bien différentes mais cette différence n'apparaît pas lors de l'analyse élémentaire des acides aminés puisque l'hydrolyse acide détruit le radical sulfato . L'étude d'hydrolysats fournit des résultats en tous points comparables pour les deux formes de l'heptadecapeptide.

Nous présentons dans le tableau II les valeurs obtenues pour quelques hydrolyses faites soit sur la Gastrine G I, soit sur la gastrine G II. A titre de standard nous rapportons les valeurs exactes pour chaque résidu, publiées par R.A. GREGORY.

Il convient de rappeler que l'hydrolyse acide détruit pratiquement tout le tryptophane et que nous n'avons pu le mettre en évidence uniquement sur le plan qualitatif à l'aide de la réaction d'Ehrlich. Il ne nous est pas possible de faire figurer dans les colonnes des résidus la valeur réelle de cet acide aminé. Nous savons cependant que la Gastrine comprend 2 résidus et nous admettons qu'ils existent au sein des peptides isolés.

Sur le tableau III, nous présentons les résultats obtenus à partir d'hydrolysats de la fraction gastrinique issue du Sephadex G 50. Le calcul des résidus n'offre pas des résultats aussi nets que dans le tableau précédent. Il nous a paru intéressant néanmoins de calculer la valeur en Gastrine en prenant quelques acides aminés comme repaires : nous avons choisi la Tyrosine, la Phenylalanine et la Proline.

Le calcul en tenant compte de la prise d'essai hydrolysée, permet de rapporter en hormone antrale les quantités injectées à l'animal, à ce stade, et d'étalonner exactement la préparation, les valeurs trouvées sont souvent proches de 60 %.

Tableau II
GASTRINE DE PORC

	Residus selon R.A. GREGORY	G I nanomoles		Résidus (moyenne)	G II nanomoles			Résidus (moyenne)
		1	2		1	2	3	
ASP	1	238	290	1,01 = 1	250	279	81	1,16 = 1
THR		12	21	0,06	46	26	8	0,15
SER		48	31	0,15	137	83	48	0,51
GLU	5	1,097	1,500	5,00 = 5	1,125	1,843	452	5,40 = 5
PRO	1	204	287	0,94 = 1	226	250	90	1,08 = 1
GLY	2	410	566	1,88 = 2	438	529	177	2,19 = 2
ALA	1	216	247	0,89 = 1	232	139	81	0,86 = 1
VAL		11	90	0,19	51	26	9	0,16
CYS								
MET	2	430	471	1,73 = 2	364	487	189	1,99 = 2
ILLEU								
LEU		16	13	0,05	63	50	11	0,23
TYR	1	210	214	0,81 = 1	200	239	73	0,98 = 1
PHE	1	215	220	0,83 = 1	269	256	78	1,15 = 1
LYS			14	0,04	45	28	3	0,14
HIST		18	15	0,06	42	28	3	0,13
ARG					23	14	18	0,10
TRY	2	Ehrlich	Ehrlich		Ehrlich	Ehrlich	Ehrlich	
		++	++		++	++	++	

Résultats obtenus à partir de 2 hydrolysats de Gastrine G I et de 3 hydrolysats de Gastrine G II.

Les deux peptides ont été purifiés par deux chromatographies sur Amino Ethyl Cellulose et une filtration sur Séphadex G 10.

Hydrolyse de 24 heures avec HCl 6 N.

Les résidus sont calculés sur la moyenne des résultats des 2 hydrolyses (G I) et des 3 hydrolyses (G II).

Tableau III.

HYDROLYSE DE LA FRACTION BIOLOGIQUEMENT ACTIVE ISOLEE DU SEPHADEX G.50

	<u>nanomoles</u>	<u>résidus</u>	
ASP	132	3,73	4
THR	40	1,1	1
SER	135	3,8	4
GLU	190	5,3	5
PRO	42	1,19	1
GLY	272	7,67	8
ALA	107	3,02	3
VAL	42	1,19	1
CYS			
MET	59	1,80	2
ILE			
LEU	59	1,80	2
TYR	35	1,0	1
PHE	37	1,05	1
LYS	59	1,8	2
HIST	32	0,91	1
ARG			
TRY	Ehrlich ++		

L'hydrolysats dont la prise d'essai est de 300 µg comprend outre la gastrine, des impurétés peptidiques et des sels d'ammonium qui n'ont pu être éliminés. Nous admettons que les éléments suivants : 1 TYR, 1 PHE, 1 PRO, 2 MET et 5 GLU sont des constituants de l'heptadécapeptide ; le résidu tyrosyl, servant d'étalon permet de savoir qu'il existe 35 nanomoles de Gastrine soit en poids 73,5 µg d'hormone dans la prise d'essai. Le rendement en Gastrine dans le mélange de peptide hydrolysé est obtenu par le rapport entre le poids moléculaire de l'heptadécapeptide et la somme des poids moléculaire des acides aminés obtenus. Dans l'exemple que nous rapportons, ce calcul aboutit à un rendement proche de 60 % ($\frac{2114}{3500}$). Il ne s'agit que d'une approximation puisque nous ignorons le nombre de résidus tryptophyles dans l'hydrolysats.

2°- RESULTATS BIOLOGIQUES

a) Une grande partie du travail exécuté dans le domaine biologique utilise le rat préparé selon la méthode de Gosh LaI ; en effet la poursuite de l'isolement d'un tel produit biologiquement actif n'a pu être envisagée qu'à la condition que toutes les étapes soient contrôlées chez l'animal. Le seuil de stimulation d'une fraction gastrinique est défini par la réponse sécrétoire égalant ou dépassant le double de la sécrétion basale de l'animal, et ce, tout au long des manipulations, en injectant une quantité équivalente à 1/250 d'autre.

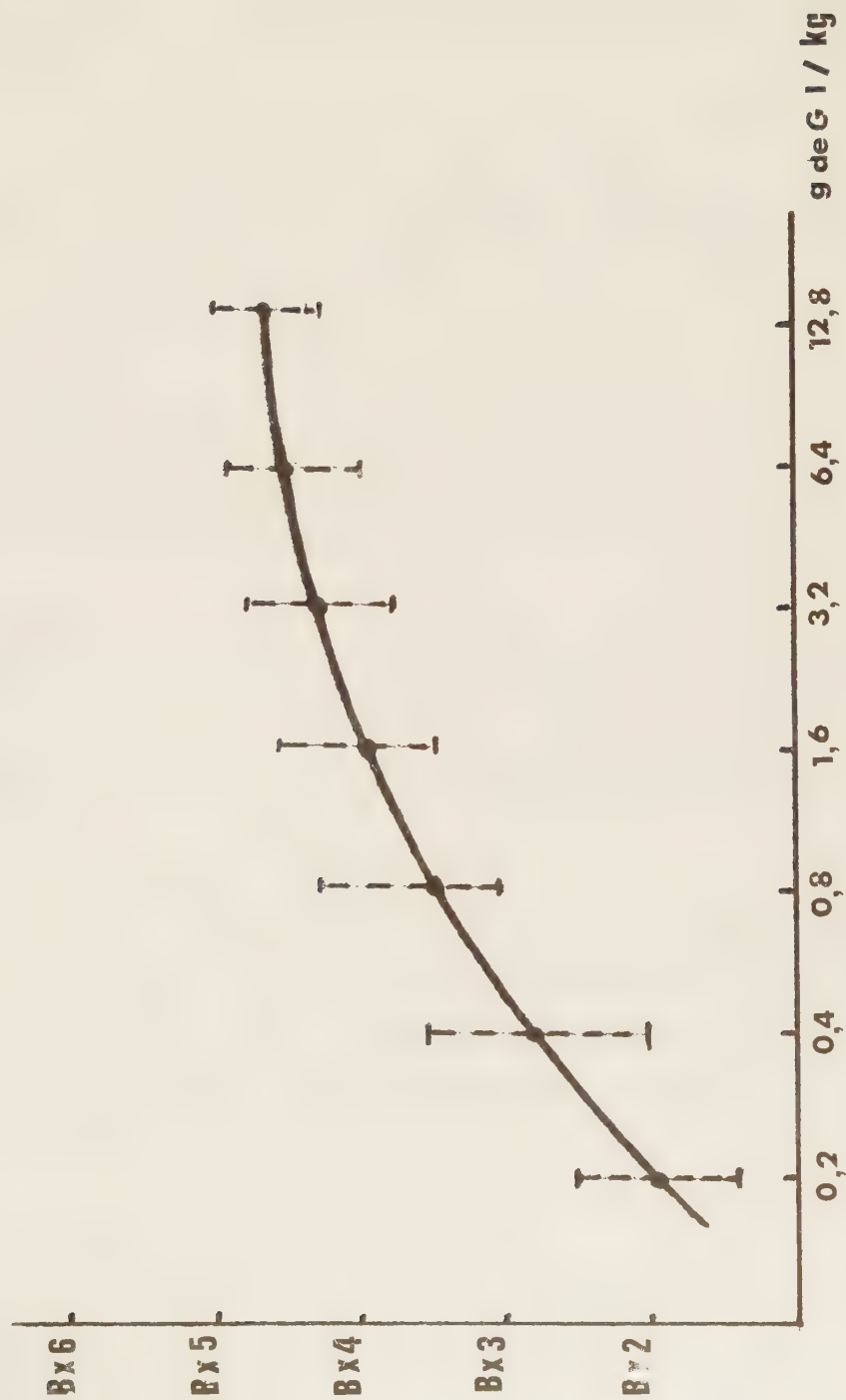
b) La Gastrine G I a servi à établir des courbes dose-réponse chez le rat.

La Gastrine G I a été utilisée chez le rat selon la technique de Gosh LaI. Elle est administrée en une injection par voie veineuse à des doses de 0,2, 0,4, 0,8, 1,6, 3,2, et 6,4 µg par kg. Chaque dose a été injectée à 6 animaux. Les résultats obtenus sont exprimés par le facteur d'accroissement de la sécrétion basale de chaque animal. Bien que les écarts type calculés sur les réponses pour chaque dose soient assez importants, sans doute en rapport avec les différences de sensibilité entre animaux, il est possible d'obtenir une bonne courbe dose-réponse (Schéma n° 3).

c) Chez le chien nous avons étudié particulièrement 4 stades de la préparation en injectant par voie sous cutanée en injection unique, les substances à tester.

- liquide d'élution de la DEAE, directement et après lyophilisation
- Précipité obtenu par acidification de cet éluat.

SCHEMA No3



Courbe Dose Réponse obtenue avec la Gastrine 61 sur le rat (tech. de Lai)

la réponse est exprimée par le facteur de multiplication de la sécrétion de base (B)

- Fraction éluée du Sephadex G 50.

- Fraction G I et G II après Aminoéthylcellulose,

..

Le liquide d'élution de la DEAE a été injecté en équivalent d'une antre ou d'une demi-antre.

L'étude du suc gastrique recueilli comprend :

- 1/ La mesure de l'acidité. Celle-ci est très fortement augmentée par la stimulation gastrinique et nous devons trouver des valeurs de débit acide et de concentration acide élevées.
- 2/ La détermination de l'activité protéolytique. La sécrétion de pepsine est par contre peu stimulée. Des valeurs peu élevées sur les échantillons recueillis après stimulation sont un argument en faveur de la nature gastrinique des produits injectés.

Les résultats montrent (Tableau IV) que la stimulation obtenue est particulièrement puissante : en effet, il est évident que la sécrétion acide des animaux s'est prolongée au delà des 3 heures représentées sur ce tableau, puisque les concentrations d'acide à la 3ème heure sont encore très élevées.

Le maximum de la sécrétion à la première heure est situé entre 30 et 45 minutes après l'injection. Malgré les variations individuelles des 3 chiens ayant servi aux tests, il ressort que la stimulation de la sécrétion acide débute dès la première heure et atteint un maximum durant la seconde heure. L'activité protéolytique est relativement basse et se maintient à un niveau bas durant le test.

Tableau IV

RESULTATS DE TESTS SECRETOIRES CHEZ LE CHIEN A L'INJECTION DU LIQUIDE D'ELUTION
DE LA D.E.A.E. SANS CHOLINERGIQUE

Deux types de montage sont utilisés : - fistule gastrique et poche de Heidenhain.
Injection sous-cutanée unique.

Dose Injectée	1ère heure			2è heure			3è heure		
	D.A.	A.L.	A.P.	D.A.	A.L.	A.P.	D.A.	A.L.	A.P.
Chien 1 Fistule 1 antre	11,613	140	1240	13,872	140	1020	6,030	130	895
Chien 2 Fistule 1/2 antre	11,700	152		12,370	150		3,804	112	
Chien 3 Fistule 1/2 antre	0,220	60	380	4,278	136	500	2,981	134	450
Chien 3 1/2 antre	3,954	110	300	2,884	120	470	1,176	112	570
Chien 4 Poche de Heidenhain 1/2 antre	1,195	100	330	3,447	140	150	2,187	140	150

D.A. : débit acide horaire en mEq. - A.L. : concentration acide libre maximale -mEq/l
A.P. : activité protéolytique en µg de tyrosine libéré par millilitre de suc gastrique.

La quantité de gastrine injectée, calculée à la fin de l'isolement de l'hormone peut être calculée sur la base de 60 μg par antre ce qui représente en moyenne de 1 à 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ d'hormone pure injectée au cours de ces tests (3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour l'équivalent de 1 antre et 1 à 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour l'équivalent de une demi-antre).

Sur le chien 1 nous avons pratiqué le même test mais après avoir lyophilisé l'éluat de DEAE.

Nous pensions par ce procédé pouvoir concentrer les protéines et faciliter les opérations ultérieures.

Nous obtenons les résultats suivants pour l'injection de 1/2 antre :

1ère heure :	D.A. :	3,690	A.L. :	132	AP :	640
2ème heure :	D.A. :	8,722	A.L. :	128	AP :	930
3ème heure :	D.A. :	8,070	A.L. :	136	AP :	1290

D.A. : débit acide horaire (mEq)

A.L. : acidité libre maximale (mEq/l)

A.P. : activité protéolytique en μg de tyrosine libérée par ml de suc gastrique.

Il résulte que les débits acide et les concentrations acide sont moins élevés que lors de l'injection de l'éluat non lyophilisé.

Ces résultats que d'autres tests ont confirmés nous ont contraints à traiter l'éluat directement.

Il est néanmoins possible à ce stade de conserver l'éluat, à titre d'extrait antral, par congélation, à -20° en ayant pris la précaution de répartir le liquide en échantillons (équivalents par exemple à 1 anstre) de telle sorte qu'au moment de l'emploi on ne décongèle que la fraction à utiliser. Les expériences faites sur la conservation par congélation ont été faites sur le rat et non sur le chien ; il en ressort que l'activité est conservée sans variations pendant 3 mois au moins.

Le précipité obtenu à partir de l'éluat de la DEAE peut être aisément remis en solution par l'ammoniaque et injecté chez l'animal à la posologie de une 1/2 anstre en une injection unique, les résultats obtenus (tableau V) montrent que l'activité gastrinique existe mais elle est beaucoup plus faible et moins durable, ce que nous ne pouvons expliquer.

Après G 50 nous constatons des résultats meilleurs que pour le précipité étudié ci-dessus (tableau VI).

Le tableau VII montre les résultats obtenus pour l'injection de G I et de G II pour une posologie de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Nous remarquons que les débits acide horaires sont élevés, les concentrations de pepsine assez basses mais les concentrations acide maximum ne dépassent pas 124 mEq. Il s'agit en réalité de premiers résultats obtenus sur le chien à partir de peptides purs. GREGORY montre que l'injection de 20 μg des Gastrine G I et G II chez des chiens munis de poche de Heidenhain provoque une sécrétion dont le débit acide est compris entre 2 et 3 mEq ; par comparaison la stimulation pour 360 μg d'histamine entraîne un débit acide de 1 à 2 mEq ; les volumes sécrétés sont plus élevés pour G I et G II que pour l'histamine.

Il semble donc que l'on puisse obtenir des préparations gastriniques de degré de pureté différent à 3 stades :

Tableau V

RESULTATS DES TESTS SECRETOIRES CHEZ LE CHIEN A L'INJECTION DU PRECIPITE
A pH 4 DE L'ELUAT DE D.E.A.E. APRES REDISSODUTION DANS L'AMMONIAQUE

Les tests sont pratiqués sans cholinergique - Injection sous cutanée unique .

Dose injectée	1ère heure			2è heure		
	D.A.	Conc. A.L.	A.P.	D.A.	Conc. A.L.	A.P.
Chien 3 <u>Fistule</u> 1/2 antre	0,102	34	380	1,721	106	500
Chien 2 <u>Fistule</u> 1/2 antre	1,860	136	600	6,368	146	600

D.A. : Débit Acide Horaire

A.L. : Concentration Acide libre maximale

A.P. : Activité proléolytique (en µg de tyrosine libéré par millilitre de suc gastrique).

Tableau VI

RESULTATS DES TESTS SECRETOIRES CHEZ LE CHIEN A L'INJECTION DE LA FRACTION GASTRIQUE ELUEE DU SEPHADEX G 50

(injection sous cutanée unique)

Les tests sont pratiqués sur le même animal, sans cholinergique ; le premier test a duré 4 heures : 2 heures après la première dose et 1 heure après les deux doses suivantes.

Le second test a duré 5 heures : 2 heures après la première et la seconde dose et 1 heure après la 3^e dose.

	Dose injectée	Equivalence en gastrine	1ère heure		2è heure		3è heure		4è heure		5è heure	
			I.A	A.L	A.P	D.A	A.L	A.P	D.A	A.L	A.P	A.L
Test 1	1/4 antre	1 µg/kg	2.160	130	900	2.192	140	950				
	1/2 antre	2 µg/kg						5.812	130	720		
	3/4 antre	3 µg/kg						7.556	138	540		
Test 2	1/4 antre	1 µg/kg	1.160	70	420	2.680	100	300				
	1/2 antre	2 µg/kg						7.574	130	290	8.180	122
	3/4 antre	3 µg/kg									7.722	138
												310

D.A Débit acide horaire en mEq

A.L Concentration acide libre maximale en mEq/l

A.P Acidité protéolytique (en µg de tyrosine libéré par millilitre de suc gastrique)

Tableau VII

RESULTATS DES TESTS SECRETOIRES CHEZ LE CHIEN A L'INJECTION DE GI ET DE G II

Injection unique sous cutanée sans cholinergique

Dose injectée	1ère heure			2è heure		
	D.Δ.	Conc. Δ.L.	Δ.P.	D.Δ.	Conc. Δ.L.	Δ.P.
Chien 5 2 µg/kg <u>Fistule</u> de G I	5,465	124	450	8,000	108	500
Chien 6 2 µg/kg <u>Fistule</u> de G II	3,751	114	430	6,281	124	600

D.Δ. : débit acide horaire mEq

Δ.L. : concentration acide libre maximale mEq/l

Δ.P. : activité protéolytique en µg de tyrosine libéré par ml de suc gastrique

- Le liquide d'élution de la DEAE est doué d'une activité gastrosecrétagogue intense et prolongée. Nous pensons que l'on peut utiliser cet extrait grossier pour des travaux de physiologie.
- La fraction gastrinique éluée du Sephadex G 50 peut être utilisée, elle renferme moins d'impuretés et nous savons qu'il est possible par la mesure des acides aminés de déterminer son titre en hormone pure.
- Enfin, l'hormone pure reste le réactif le meilleur pour des études physiologiques et pharmacologiques.

Le tableau VIII rassemblant les résultats obtenus sur la sécrétion acide de 3 chiens munis de fistule, à l'injection d'une quantité à peu près équivalente à 2 µg de Gastrine pure, des préparations gastriniques à différents stades.

Aucune de ces préparations ne renferme d'histamine, ceci a été vérifié par dosage biologique. On peut ajouter d'ailleurs que les doses d'histamine capables de stimuler le rat sont nettement supérieures aux quantités de préparation gastrinique injectées ayant provoqué une stimulation de la sécrétion acide.

C - CONCLUSIONS

L'ensemble des résultats obtenus sur le plan clinique peuvent se résumer aisément :

- La préparation de l'hormone pure est longue et délicate. Le rendement est de l'ordre de 60 µg par ancre (25 µg de G I et 35 µg de G II en moyenne).

REPONSES SECRETOIRES CHEZ LE CHIEN A L'INJECTION DE PREPARATION GASTRINIQUE A DIFFERENTS STADES.

(Injection unique sans cutanée sans cholinergique).

Les tests ont été pratiqués sur 3 chiens, munis de fistule gastrique, et de poids pratiquement identiques. Les résultats ne concernent que la sécrétion acide.

	Quantité injectée	Equivalence en gastrine	1ère heure		2è heure		3è heure	
			D.A.	A.L.	D.A.	A.L.	D.A.	A.L.
Eluat de D.E.I.E.	1/2 antre	2 µg/kg	3,954	110	2,884	120	1,176	140
Fractious éluées du Séptadex G 50	1/2 antre	2 µg/kg	6,250	110	9,000	144	1,930	122
Aminoéthyl-cellulose		G II 2 µg/kg	3,751	144	6,281	124	2,800	92

D.A. Débit acide horaire en mEq

A.L. Concentration acide libre maximale en mEq/l

- G I et G II possèdent (au tryptophane près) le nombre théorique des acides aminés décrits par R.A. GREGORY.

- On peut calculer la quantité de Gastrine sur la fraction issue de Sephadex G 50.

- Enfin l'électrophorèse montre la différence de migration attendue entre G I et G II.

Il manque à notre travail l'identification de l'hormone antrale par radioimmunologie, mais nous ne disposons pas d'anticorps spécifiques à des taux suffisants.

Sur le plan biologique, l'hormone pure au stade de l'heptadécapeptide est un excellent stimulant de la sécrétion acide. La stimulation de la sécrétion est également excellente avec le mélange des deux hormones après chromatographie sur Sephadex G 50 ; ceci est d'autant plus intéressant que l'on peut convertir la prise d'essai injectée en équivalent de Gastrine.

Mais on reste frappé de ce que la meilleure réponse biologique soit fournie par l'éluat de la DEAE qui n'est qu'un extrait brut grossier : l'équivalence en hormone calculée à posteriori montre que les injections uniques pratiquées chez les chiens sont de l'ordre de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour un antre et de 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour un demi-antre.

Le surnageant éliminé après précipitation de l'éluat par l'acide acétique à pH 4 reste doué d'une activité gastrosecrétagogue qui bien que moins intense pourrait potentialiser celle de l'hormone. La nature du composé stimulant dans le surnageant, n'est pas encore connue et deux hypothèses viennent à l'esprit :

1°- Il existe une forme de Gastrine qui ne précipite pas ou qui se trouve protégée de la précipitation par des protéines.

2°- Ou bien, il existe dans l'antre, un autre facteur gastro-sécrétagogue potentialisant la Gastrine et qui reste en solution à pH 4.

IV - APPLICATION DES METHODES D'ISOLEMENT ET DE
PURIFICATION DE LA GASTRINE AUX FACTEURS
GASTROSECRETAGOGUES URINAIRES

A - INTRODUCTION

B - OBSERVATIONS CLINIQUES

1°- Cas n° 1

2°- Cas n° 2

C - PROTOCOLE EXPERIMENTAL POUR L'EXTRACTION ET L'ISOLEMENT

1°- Extraction

2°- Isolement et purification

D- RESULTATS

1°- Etude du rendement en fonction du pH d'extraction

2°- Etude des chromatographies sur Sephadex G 25

3°- Purification des deux pics biologiquement actifs

4°- Détermination de la composition en acides aminés des
deux facteurs gastrosecrétagogues isolés.

5°- Etude biologique des fractions V et G

a) chez le rat

b) chez le chien

IV - APPLICATION DES METHODES D'ISOLEMENT ET DE
PURIFICATION DE LA GASTRINE AUX FACTEURS
GASTROSECRETAGOGUES URINAIRES

A - INTRODUCTION

L'extraction présente des différences avec l'extraction de la gastrine antrale, puisque le milieu biologique étudié est liquide et beaucoup moins chargé en protéines.

Notre travail de recherche (4) a été amorcé avant que la gastrine ne soit isolée et caractérisée par R.A. GREGORY. L'existence dans les urines de sujets atteints de syndrome de Zollinger-Ellison d'une activité gastrosecrétagogue mise en évidence par le test P.S.U. nous avait conduit à penser que cette activité dépendait d'une hormone et que l'application de certaines méthodes couramment utilisées en hormonologie permettrait d'extraire le facteur responsable de l'activité biologique (51).

En effet l'extraction par le chloroforme aboutit à un extrait dont l'activité biologique reste comparable à celle des urines.

Nous avons choisi d'étudier la nature des substances gastrosecrétatrices en utilisant ce mode d'extraction.

B - OBSERVATIONS CLINIQUES

Dans le cadre du Service et de l'Unité de Recherches du Professeur S. BONFILS, la population de sujets atteints de Syndrome de Zollinger-Ellison est relativement importante (51 cas). Mais il n'est pas toujours possible de pouvoir recueillir les urines de ces sujets en raison de l'urgence thérapeutique nécessitant leur hospitalisation pour intervention chirurgicale.

Nous avons disposé des urines de deux malades différents. Sur une petite quantité des urines du malade N° 1 nous avons pu mettre au point un protocole d'extraction et d'isolement des facteurs gastrosecrétagogues. Ce protocole a été appliqué à 5 litres d'urines du malade n° 1 et à 6 litres d'urines du malade n° 2.

Cas n° 1 : Mme M... née en 1935

Admise à l'hôpital Beaujon dans le Service du Professeur AZERAD, le 10 décembre 1967 pour coma hypoglycémique.

1 - Antécédents

1959 : découverte lors d'une hospitalisation à Alger pour douleurs du moignon de l'épaule, de multiples géodes de l'extrémité supérieure de l'humérus, omoplate et acromion, d'une hypercalcémie à 137 mEq/l.

1961 : Altération de l'état général - Douleurs osseuses.

Décembre 1961 : Adénomectomie parathyroïdienne.

1964 : Découverte d'une bacillose pulmonaire.

Octobre 1964 : Colique néphrétique avec émission de calculs de phosphate de chaux.

1967 : Hospitalisation à Beaujon pour amaigrissement de 11 kgs, douleur de l'hypocondre droit avec vomissements matinaux à jeun.

Un traitement symptomatique n'entraîne pas d'amélioration. Persistance des douleurs épigastriques et apparition d'épisodes de somnolence avec grande asthénie cédant spontanément.

10 décembre 1967 :

Hospitalisation pour coma hypoglycémique.

Pendant cette période pré-opératoire, deux faits dominant :

- . les accidents hypoglycémiques,
- . la symptomatologie douloureuse, épigastrique.

Les manifestations d'hypoglycémie vont disparaître à peu près totalement après l'instauration d'un régime normoglucidique fractionné dans les 24 heures. Le syndrome douloureux épigastrique persiste depuis 10 mois environ, fait de douleurs modérées à types de crampes, de brûlures siégeant au niveau de l'épigastre, sans rapport évident avec l'alimentation. Très inconstamment surviennent des vomissements à jeun. L'examen radiographique du transit gastro-duodénal montre une très importante hypertrophie du plissement gastrique avec une grande quantité de liquide d'hypersécrétion. On ne voit pas de niche gastrique. Le bulbe est mal opacifié, très oedémateux, avec des plis très épaissis, il n'y a pas d'image de niche certaine.

Conclusion : aspect de gastro-duodénite, important oedème du bulbe sans niche certaine.

Le transit du grêle montre des modifications importantes du plissement duodénal et jéjunal. Aspect pseudo-polypeux de D 2 et D 3, aspect oedémateux et spiculaire du jéjunum.

Conclusion : l'aspect du duodénum et du jéjunum associé aux modifications gastriques est compatible avec le diagnostic de Zollinger-Ellison.

Absence de diarrhée mais découverte d'une stéatorrhée modérée dont témoigne le fécalogramme.

L'association d'un syndrome ulcéreux évoquant sur les modifications radiologiques un syndrome de Zollinger-Ellison, d'une hyperparathyroïdie, d'hypoglycémies organiques, fait porter le diagnostic de polyadénomatose endocrinienne, ce que confirment les investigations cliniques et biologiques. Elles permettent de retrouver un goitre euthyroïdien, d'affirmer la nature organique de l'hypoglycémie, de retrouver une hyperparathyroïdie avec lésions d'ostéite fibro-kystique disséminées sur le squelette.

Enfin l'exploration biologique des surrénales donne des résultats compatibles avec une hyperplasie cortico-surrénalienne.

Pendant cette période deux crises douloureuses épigastriques surviennent.

La seconde, début février 1968, est marquée par l'apparition brutale d'une violente douleur de l'hypocondre droit avec météorisme abdominal, vomissements, clocher thermique à 38°, qui fait suspecter une perforation d'ulcère.

Les radiographies d'abdomen sans préparation sont normales. Cet épisode cède en 48 heures.

On constate alors une anémie et une hyperleucocytose : l'intervention est décidée.

Les explorations de la sécrétion gastrique montrent d'importants volumes sécrétoires, une hyperchlorhydrie de concentration et des débits élevés, une corrélation acide/pepsine " K 25 à 12.

Un test P.S.U. positif est retrouvé, l'ensemble des examens confirme le diagnostic de syndrome de Zollinger-Ellison.

3 - L'intervention chirurgicale le 13.2.1968 (Professeur J. MAILLARD)

Médiane sus ombilicale.

L'estomac contient une grosse quantité de liquide. Au niveau du premier duodénum on trouve un ulcère récemment perforé et bouché par le foie.

Décollement colo-épiploïque et décollement rétro-duodéno-pancréatique. On met en évidence deux tumeurs pancréatiques : la première est visible sur la face antérieure de la queue du pancréas : elle est du volume d'une cerise et rouge foncé ; la deuxième est dans le hile de la rate, polylobée, blanchâtre, de volume d'une noix et évoque une adénopathie. Il existe en plus un deuxième ulcère postérieur en face du premier. La tête du pancréas est normale à la palpation et à la vue. Le pédicule hépatique et le foie sont normaux. Les deux surrénales sont volumineuses et le siège d'une adénomatosose diffuse. La rate est petite, avec quelques adhérences à la coupole diaphragmatique.

Gastro-duodénectomie totale, avec spléno-pancréatectomie gauche.

4 - Examen anatopathologique (Pr. F. POTET et J. BARGES)

a) La tumeur est faite de cellules d'assez petite taille, polygonales ou parfois vaguement cylindro-cubiques, à noyaux petits et égaux entre eux, sans mitose. Ces éléments s'agencent parfois en larges nappes séparées par

des travées scléro-hyalines ; en périphérie, les cellules ont tendance à se ranger par endroit de façon palissadique. Les nappes tumorales sont parcourues de tractus conjonctifs, vascularisés qui leur donnent une allure endocrinofide. En d'autres points, la structure devient un peu trabéculée avec des cellules nettement cylindriques. Le stroma, par endroits, forme de véritables amas de sclérose.

b) La structure de la métastase ganglionnaire est sensiblement identique à celle de la tumeur.

c) Vingt et un microadénomes ont été retrouvés sur les tranches de section sériées du pancréas.

Leur structure peut être schématisée de la façon suivante :

- l'aspect alvéolaire est fait de petits massifs cellulaires arrondis, séparés par des tractus conjonctifs grêles. Dans ces massifs apparaissent parfois des agencement pseudoacineux. Les cellules sont en règle générale assez claires.

- la structure trabéculée se compose de cellules en général cylindro-cubiques, séparées par un tissu conjonctif bien vascularisé.

- Enfin dans certaines tumeurs, en général plus volumineuses, existe une structure intermédiaire entre les aspects en nappes, alvéolaires et trabéculées. Certains de ces microadénomes présentent des modifications du stroma : fibrose, hyalose, et même dépôts d'amyloïde confirmés par la méthode de la Thioflavine T.

Après une étude histochimique, les conclusions sont les suivantes :

- la tumeur la plus importante et la métastase ganglionnaire contiennent de façon nette des cellules assez volumineuses, porteuses de grains Hollman positifs, fins et épars. Cette tumeur ainsi que deux micro-adénomes peuvent donc être probablement rattachés au syndrome de Zollinger-Ellison.

- il n'a pas été retrouvé de tumeur insulino-sécrétante.

- De façon surprenante, il semble exister plusieurs tumeurs dont les cellules très granulées ne prennent les réactions ni des cellules Beta, ni des cellules Alpha 1. La réaction de Glanner, positive, les rapproche de ce que l'on a décrit dans les cellules Alpha 2.

...

Nous remercions le Professeur E. AZERAD et ses collaborateurs,
le Professeur J. LUBETZKI et le Docteur J. Cl. CROISIER, de nous avoir
permis l'étude de ce cas.

Cas n° 2 : Mme P... née en 1908

Juillet 1966 : première manifestation de la maladie sous la forme d'un syndrome douloureux épigastrique post-prandial survenant par crises, accompagné de vomissements alimentaires.

Janvier 1967 : amaigrissement de 20 kg en six mois.

Examen radiologique : ulcère antro-pylorique.

Intervention chirurgicale (Dr. MARUELLE) : découverte d'un énorme ulcère térébrant du pylore perforé dans le pancréas.

Gastrectomie des 2/3 et anastomose gastro-jéjunale.

Février 1967 : Réapparition du syndrome douloureux accompagné de diarrhée (5 à 6 selles par jour).

Radiologiquement : ulcère anastomotique.

Juillet 1967 : deuxième intervention chirurgicale (Dr. MARUELLE)

Découverte d'une tumeur au niveau de la queue du pancréas.

Vagotomie.

Mars 1968 : Hospitalisée service BONFILS

Le diagnostic de syndrome de Zollinger-Ellison est évoqué.

Le tubage gastrique montre une hyperchlorhydrie.

(Débit horaire : 7,228 mEq et 8,622 mEq) malgré gastrectomie des 2/3 et la vagotomie.

La recherche du Pouvoir Gastrosecrétagogue Urinaire (P.S.U.) est positive.

Radiologiquement : volumineux ulcère anastomotique.

Intervention chirurgicale (Dr MOREAUX) : spléno-pancréatectomie gauche et Gastrectomie totale. L'ulcère anastomotique est volumineux et perforé dans le mésentère ; découverte d'une tumeur multilobée de la queue du pancréas et de métastases à la face inférieure du foie.

Etude histologique :

1°- La tumeur pancréatique est partout constituée par des nodules plus ou moins polylobés et confluants et dont la structure est légèrement variable.

En certains territoires, il s'agit d'une prolifération de grandes cellules cylindriques acidophiles et qui sont agencées en cordons à la périphérie desquelles il existe une disposition palissadique des éléments.

En d'autres, il s'agit de cellules rondes ou polygonales placées les unes contre les autres agencées en nappes plus ou moins homogènes parcourues par un lacis vasculaire assez régulier.

En d'autres territoires enfin, il s'agit de petites travées cellulaires sinueuses plus ou moins anastomosées, constituées par une ou deux assises de cellules entre lesquelles on retrouve un lacis vasculaire extrêmement différencié, souvent abondant et qui subit de place en place un début de transformation scléreuse ou hyaline.

Cette prolifération reste dans l'ensemble assez régulière, mais l'examen à fort grossièrement montre la présence de quelques inégalités nucléaires et de rares mitoses.

Entre les nodules il existe un stroma scléreux ou hyalin extrêmement abondant qui comporte quelques reliquats de travées épithéliales en voie d'atrophie.

Il persiste à la périphérie de la tumeur dans un tissu scléroliponateux abondant, quelques reliquats d'ilots de Langerhans tantôt subnormaux, tantôt atrophiques et qui constituent les seuls témoins du parenchyme préexistant. On ne décèle en effet, aucune trace de parenchyme exocrine.

Dans le péri-pancréas, les artères ont presque toutes une lumière effacée par une endartérite proliférante intense.

Les veines ont une paroi scléreuse et on retrouve plusieurs aspects d'engainement ou d'envahissement des filots nerveux par des petits boyaux tumoraux isolés.

Sur un des prélèvements, on trouve un nodule de près de 1 cm de diamètre et qui est implanté sur la paroi de la veine splénique obstruant presque complètement sa lumière. Ce nodule a une structure endocrinoïde très poussée.

L'artère splénique conserve une morphologie normale.

Les petits ganglions de voisinage immédiat ne sont pas manifestement envahis.

2°- Les prélèvements gastriques montrent qu'il s'agit d'une zone fundique dont les tubes glandulaires ont une hauteur légèrement variable et présentant d'assez nombreuses zones atrophiques.

Ces tubes comportent un contingent de cellules bordantes acides qui paraît tantôt sub-normal, tantôt nettement diminué.

La zone superficielle est constituée de cellules mucoïdes de morphologie régulière qui sont soulevées par une discrète suffusion oedémateuse.

En profondeur, sur les colorations standard, les cellules principales paraissent assez souvent clarifiées et pauvres en granulations de pepsinogène.

3°- Au niveau des zones de suture, on retrouve d'une part des granulomes macrophagiques pariétaux et d'autre part quelques petits abcès développés au contact de ces fils chirurgicaux.

Il existe de petites érosions situées très exactement sur la zone de suture.

4°- Sur les prélèvements de l'ulcération, la paroi intestinale grêle est totalement amputée par un foyer de sclérose et de nécrose qui est infiltrée par une assez grande quantité d'éléments inflammatoires dans lesquels on retrouve là encore des granulomes à corps étrangers.

Les bords de la lésion sont le siège d'une infiltration inflammatoire lymphoplasmocytaire et d'un infarctissement hémorragique.

Plus à distance et sur les autres prélèvements d'intestin grêle, on retrouve des villosités de hauteur régulière et normale, mais qui sont souvent épaissies par un oedème relativement récent légèrement inflammatoire ; les cellules cylindriques ne présentent pas d'atrophie épithéliale franche. Il n'existe pas d'ectasie lymphatique.

On ne trouve pas de foyers d'hétérotopie fundique.

Les petites franges péritonéales prélevées à part sont souvent scléro-lipomateuses et contiennent quelques petits foyers granulomateux à corps étrangers.

Aucun des 6 nodules ganglionnaires prélevés dans les mésos digestifs n'est envahi par une prolifération maligne.

C - PROTOCOLE EXPERIMENTAL POUR L'EXTRACTION ET L'ISOLEMENT DES FACTEURS GASTROSECRETAGOGUES URINAIRES

1°- Extraction

100 ml d'urines sont extraites durant deux heures pour 200 ml de chloroforme R.P. dans les allonges de 1 litre, placées sur un extracteur rotatif.

La phase organique est alors soutirée et une nouvelle extraction est pratiquée avec 200 ml de chloroforme pendant deux heures.

Les phases chloroformiques sont rassemblées, filtrées sur Büchner après addition de sulfate de sodium anhydre et le chloroforme est évaporé sous vide à 37°. Le résidu repris par l'eau distillée constitue un "extrait brut". Une aliquote de cet "extrait brut" est utilisée pour le test biologique.

2°- Isolement et purification

L'extrait brut subit tout d'abord un fractionnement par le Sephadex G 25. Nous avons préféré utiliser ce gel plutôt que le Sephadex G 50 en raison de **la** faible quantité de protéines de l'extrait chloroformique.

Puis les fractions biologiquement actives sont traitées sur Amino-éthylcellulose. Nous pratiquons deux chromatographies successives. Sur cette résine pour éliminer les impuretés peptiques.

Enfin, une filtration sur Sephadex G 10 achève la purification en enlevant les sels minéraux des préparations.

Chaque stade est suivi d'une étude de l'activité gastrosecrétagogue sur le rat.

D - RESULTATS

1°- Etude du rendement (exprimé en activité biologique) en fonction du pH d'extraction.

A partir d'un même lot d'urine nous avons traité des aliquotes de 100 ml, chaque aliquote étant ajustée à des pH compris entre pH 10 et pH 4.

Chaque lot d'urine a subi une extraction chloroformique et les extraits repris par l'eau distillée après évaporation du chloroforme ont été testés. Les résultats figurent dans le tableau IX.

Il ressort que les pH optimum d'extraction sont pH 4 et pH 10 puisque la réponse biologique des extraits est identique à celle que provoque l'urine brute.

Par contre, à l'exception de l'extrait obtenu sur les urines ajustées à pH 5 qui manifeste une certaine activité, les autres pH d'extraction ne sont pas intéressants.

2°- Etude des chromatographies sur Sephadex G 25

a) En fonction des résultats ci-dessus, nous avons choisi de pratiquer les extractions seulement à pH 10, 5 et 4. Nous avons traité 3 lots de 700 ml d'urines ajustés chacun à l'un des trois pH. Les trois extraits obtenus sont alors traités sur un même type de colonne (120 cm de hauteur x 2 cm de diamètre).

Les résultats sont réunis dans le tableau n° X. Pour chaque chromatographie, les pics sont numérotés suivant l'ordre de sortie et caractérisés par le coefficient d'élution (K), rapport entre le volume nécessaire à l'élution du pic au maximum d'absorption et le volume mort de la colonne. Pour chaque pic on note également la valeur de la densité optique à 278nm et la réponse du test biologique.

Les chromatographies paraissent identiques (schéma n° 4) quant au nombre de pics, à l'exception de l'extrait à pH 10 qui ne possède par le pic 5.

Tableau IX

ETUDE DU RENDEMENT EXPRIME EN ACTIVITE BIOLOGIQUE
EN FONCTION DU pH D'EXTRACTION

Produit injecté Urine	Réponse Biologique B x 2,4
Extraits chloroformiques des urines à pH :	
4	B x 2,4
4,5	B x 1,5
5	B x 2
6	B x 1
7	B x 1
8	B x 1,5
9	B x 1,5
10	B x 2,4

Rat selon la technique de Gosh Lai.

La quantité d'extrait chloroformique injectée est rapportée à 0,5 ml d'urine brute.

A titre de comparaison nous donnons la réponse des urines pour une même quantité injectée de 0,5 ml.

L'activité biologique est mesurée par le facteur de multiplication de la sécrétion de base (B).

Tableau X

ETUDE DES CHROMATOGRAPHIES SUR SEPHADEX G 25 DES EXTRAITS URINAIRES

A pH 4 pH 5 et pH 10

Pics	1	2	3	4	5	6	7
<u>Extrait à pH 4</u>							
K	1,00	1,45	1,70	1,95	2,30	2,70	3,30
Do 278 nm	1,000	0,300*	1,800*	1,500*	0,600	0,280	0,450
Réponse biologique	B x 1	B x 1	B x 3	B x 3	B x 1	B x 2,8	B x 1
<u>Extrait à pH 5</u>							
K	1,00	1,50	1,70	1,90	2,30	2,70	3,30
Do 278 nm	0,700	0,200*	1,500	1,200*	0,450*	0,550	0,550
Réponse biologique	B x 1	B x 1,8	B x 3	B x 1,8	B x 1	B x 2	B x 1
<u>Extrait à pH 10</u>							
K	1,00	1,55	1,70	2,05		2,70	3,30
Do 278 nm	0,100	0,660	0,310	2,000		0,710	0,400
Réponse biologique	B x 1	B x 1	B x 3	B x 2		B x 2	B x 1

Colonne de Séphadex G 25 (120 cm de hauteur x 2 cm de diamètre)

Les pics sont numérotés de 1 à 7 selon leur ordre d'élution.

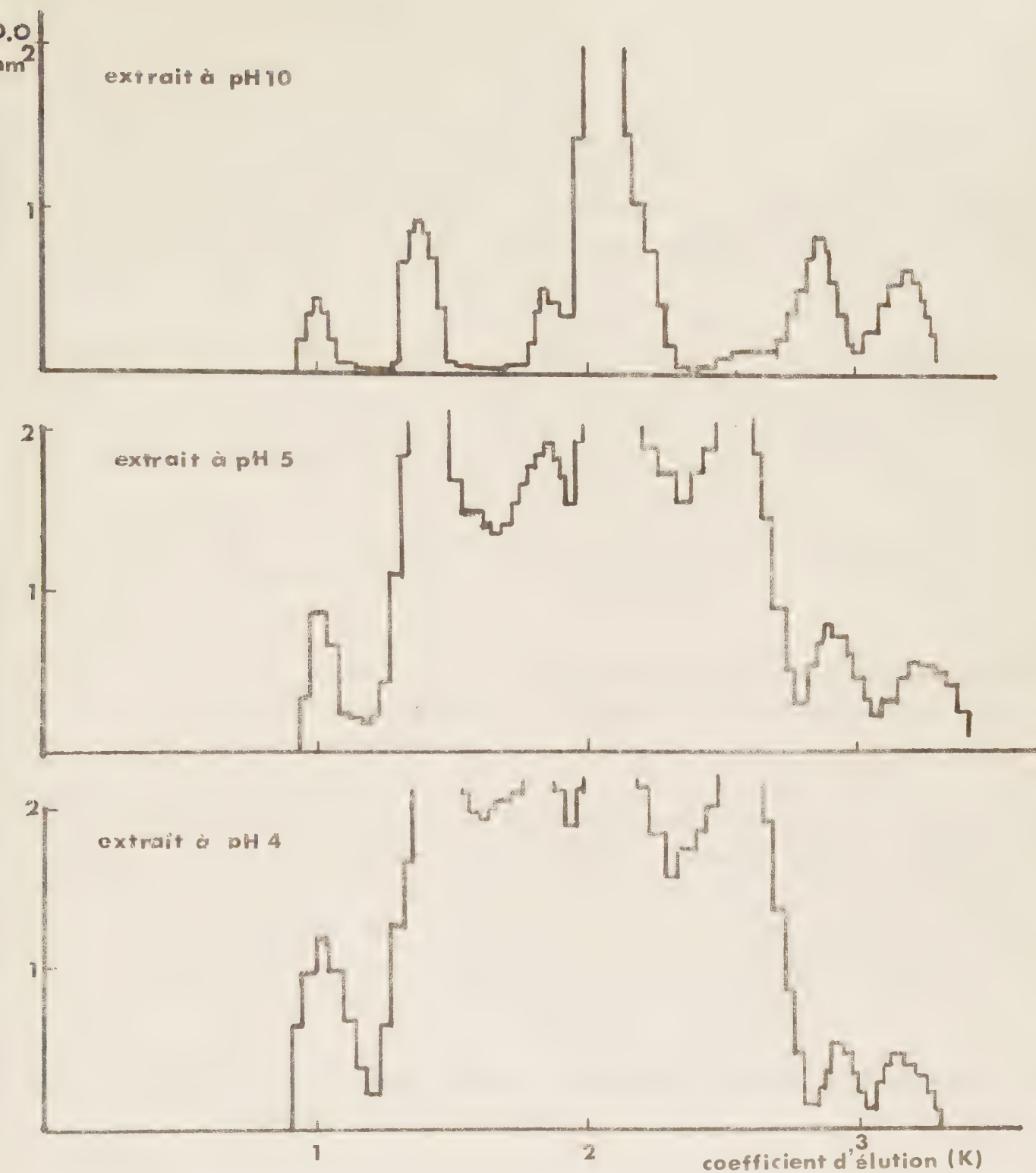
K : coefficient d'élution = $\frac{\text{volume nécessaire à l'élution du pic à son maximum de Do}}{\text{volume mort de la colonne}}$

Do : densité optique lue à 278 nm.

Réponse biologique : facteur de multiplication de la sécrétion basale (B) du rat pour l'injection d'une quantité de produit équivalente à 0,5 ml d'urine.

Les extraits sont obtenus par le chloroforme sur des lots égaux d'urines ajustés respectivement à pH 10, pH 5 et pH 4. Les chromatographies sont pratiquées pour les 3 extraits sur la même colonne.

* La densité optique est lue sur un échantillon dilué au 1/10.



SCHEMA N° 4

CHROMATOGRAPHIES SUR SEPHADEX G 25 D'UN MEME LOT D'URINES

TRAITE A 3 pH DIFFERENTS

L'activité biologique paraît bien localisée sur 2 groupes de pics : le pic 3 et, probablement par contamination, les pics 2 ou 4 d'une part, le pic 6 d'autre part. Cependant lors de l'essai biologique le délai d'apparition de la réponse maximale varie : presque immédiate pour le pic 6, retardée après l'injection pour le pic 3.

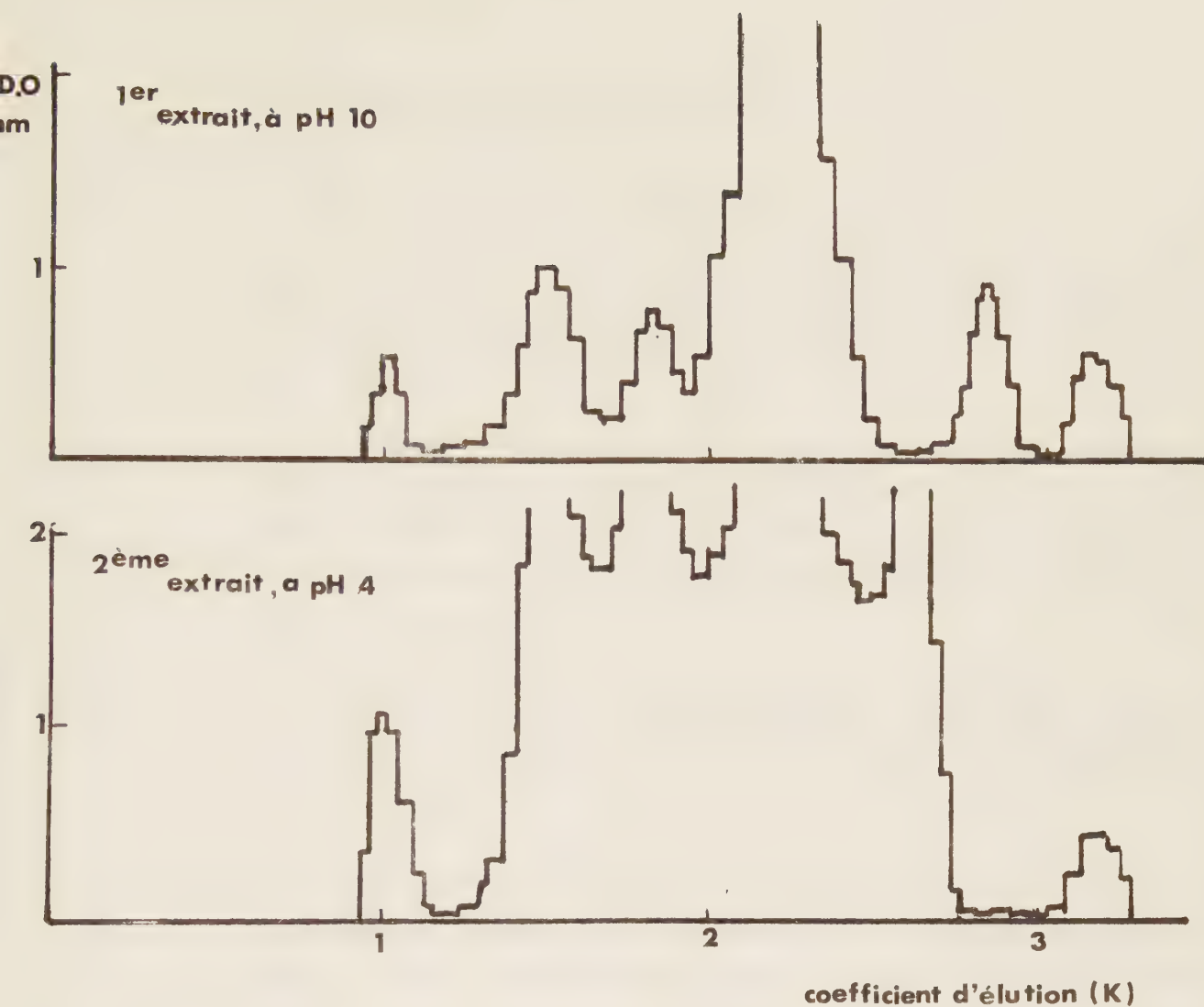
Enfin l'étude des densités optiques pour les pics biologiquement actifs montre que l'absorption U V du pic 3 s'accroît avec l'augmentation de l'acidité des urines tandis que pour le pic 6 il semble qu'il existe un phénomène inverse dans les proportions plus faibles d'ailleurs.

L'extraction à pH 5 fournit un extrait de caractéristiques intermédiaires aux extraits à pH 4 et à pH 10.

b) Enfin sur un autre lot de ces urines, nous avons pratiqué une première extraction à pH 10, puis après acidification des urines à pH 4, une seconde extraction.

Les résultats de la chromatographie (schéma n° 5) sur Sephadex G 25 à pH 10 sont en tous points semblables à ceux qui figurent sur le tableau n° X. Mais l'extrait à pH 4 présente une différence fondamentale par la disparition du pic 6, entièrement extrait à la première opération. Il nous paraît donc indispensable de traiter les lots d'urine à deux pH, pour extraire le maximum de substances gastrosecrétagogues.

Nous avons appliqué cette méthode d'extraction aux deux lots d'urines qui ont servi à ce travail.



SCHEMA N° 5

CHROMATOGRAPHIES SUR SEPHADEX G 25 D'UN MEME LOT D' URINES

TRAITE D'ABORD A pH 10, PUIS A pH 4

3°- Purification des deux pics biologiquement actifs

a) Passage sur Aminoéthylcellulose

Le pic 3 quel que soit le pH d'extraction, se décompose en 4 fractions, définies par l'absorption U V à la fois à 278nm et 230 nm et dont les deux premières sont éluées au départ du gradient.

L'activité biologique se trouve exclusivement située sur la seconde fraction qui après une nouvelle chromatographie sur A E 41 donne un pic unique à la limite de rétention de la résine, que nous appelons fraction G ; la mesure de l'ion NH_4^+ montre ce pic est élué pour une concentration de bicarbonate d'ammonium 0,050 M.

Du pic 6 on isole plusieurs substances toutes éluées sous l'influence du gradient, présentant un maximum d'absorption simultanément à 278nm et 230 nm.

Une seule de ces substances est biologiquement active : une nouvelle chromatographie permet sa purification. Nous la dénommons fraction V. Le gradient atteint une valeur de 0,150 M au maximum d'élution de cette fraction.

b) Enfin le Sephadex G 10 permet de séparer les produits biologiquement actifs des sels minéraux, en particulier du bicarbonate d'ammonium.

Nous avons trouvé les mêmes résultats en traitant les lots d'urines des 2 malades atteints de syndrome de Zollinger-Ellison.

49- Détermination de la composition en acides aminés des deux facteurs gastrosecrétagogues isolés.

Du fait que les quantités de produits biologiquement actifs isolées sont très faibles, nous n'avons pu pratiquer des électrophorèses et vérifier ainsi la pureté des peptides obtenus. Nous ne disposions en effet que de 100 µg au plus de chacune des deux substances : nous avons donc préféré pratiquer une hydrolyse acide de 24 heures et une étude biologique chez l'animal.

Les résultats des analyses sont figurés dans les tableaux XI et XII. La mesure du Rf de chaque pic sert à l'identification de l'acide aminé élué et le calcul de la surface permet d'obtenir la quantité exprimée en nanomoles de chaque acide aminé.

Nous avons déterminé le nombre de résidus possibles et nous établissons ainsi une composition en amino-acides compatible avec les résultats des chromatographies sur Sephadex.

Les résultats présentent un certain nombre de particularités.

a) La fraction G est pratiquement identique chez les deux malades. La seule différence est d'ordre quantitatif : 6 SER chez Mme M ... et 5 SER chez Mme P..., ce qui reste dans les limites d'erreurs de la technique, d'autant que la prise d'essai est très faible.

b) Cette même observation est valable pour la fraction V pour laquelle nous ne trouvons qu'une différence quantitative sur le glycolle.

...

Tableau XI

Composition élémentaire en acides aminés de la Fraction G

	Mme M...		Mme P...	
	Hydrolysats correspondant à 5 litres d'urines		Hydrolysats correspondant à 6 litres d'urines	
	Nanomoles	Résidus possibles	Nanomoles	Résidus possibles
ASP	33	2	36	2
THR	17	1	20	1
SER	93	6	96	5
GLU	72	5	75	5
PRO	16	1	18	1
GLY	180	10	196	10
ALA	38	2	40	2
VAL	18	1	19	1
CYS				
MET	38	2	42	2
ILE				
LEU	18	1	26	1
TYR	15	1	19	1
PHE	18	1	21	1
LYS	34	2	34	2
HIS	16	1	17	1
ARG	16	1	18	1
TRY	Réaction d'Ehrlich positive		Réaction d'Ehrlich positive	

Tableau XII

Composition élémentaire en acides aminés de la Fraction V

	Mme M...		Mme P...	
	Hydrolysats correspondant à 5 litres d'urines		Hydrolysats correspondant à 6 litres d'urines	
	Nanomoles	Résidus possibles	Nanomoles	Résidus possibles
ASP	33	2	63	2
THR	18	1	36	1
SER	59	4	150	4
GLU	64	4	150	4
PRO				
GLY	71	5	130	3
ALA	31	2	80	2
VAL	17	1	31	1
CYS				
MET				
ILE				
LEU	18	1	33	1
TYR				
PHE				
LYS	20	1	28	1
HIS	16	1	26	1
ARG	15	1	29	1
TRY	Réaction d'Ehrlich négative		Réaction d'Ehrlich négative	

c) Entre les fractions V et G, il existe des différences quantitatives. Il n'existe ni proline, ni méthionine, ni tyrosine, ni phénylalanine, dans la constitution de la fraction V. De plus la réaction d'Ehrlich y est négative, alors que nous l'avons trouvée positive sur G.

Les poids moléculaires calculés d'après la constitution possible en acides aminés montrent qu'il existe une différence entre la fraction V de P.M. environ 2200 et la fraction G de P.M. approximatif de 3700.

Ce calcul permet d'estimer la quantité de peptides isolés des urines et leur concentration urinaire.

Pour la fraction G, nous pouvons estimer la concentration comme étant à peu près identique chez les deux malades, c'est-à-dire de l'ordre de 12 à 14 $\mu\text{g/l}$; tandis que pour la fraction V les urines de l'un des malades contiennent 13 $\mu\text{g/l}$ alors qu'elle n'est que de 8 $\mu\text{g/l}$ pour l'autre malade.

d) Enfin dans la seule fraction G se trouvent tous les acides aminés entrant dans la composition de la gastrine antrale. Cette observation nous paraît fondamentale, car bien que nous ne puissions l'affirmer formellement, il y a là une présomption très forte pour admettre que nous avons isolé un métabolite de l'hormone.

5° - Etude biologique des fractions V et G

a) Chez le rat

Une première remarque s'impose car même en supposant une récupération quantitative des produits actifs, ce qui n'est pas prouvé, la comparaison de l'activité biologique à chaque stade de la préparation permet de constater un accroissement du rendement biologique, c'est-à-dire

...

le rapport entre Activité et dose injectée en équivalent (ml) d'urine brute.

Au stade d'extrait chloroformique à pH 10, la réponse sécrétoire se trouve être identique à celle des urines brutes : à pH 4 on observe encore une réponse, quoique plus faible.

Après Sephadex G 25 chacun des deux pics actifs donne une réponse supérieure à celle des urines.

Enfin, pour obtenir une même stimulation (B x 3) la dose à injecter en équivalence d'urine devient plus faible après Aminoéthyl-cellulose et Sephadex G 10.

Le tableau n° XIII, montre l'évolution de la réponse sur le premier lot d'urine qui a servi à ce travail.

Pour expliquer cet accroissement du pouvoir gastrosecrétagogue, deux hypothèses peuvent être émises :

- 1/- Le facteur stimulant est purifié par l'élimination d'une grande quantité de substance inerte. (ou erreurs de pesée dans les prises d'essai).
- 2/- Nous avons éliminé une ou plusieurs substances inhibitrices que nous ne pouvions pas mettre en évidence par les tests biologiques tels que nous les avons employés.

Quant à la forme de la réponse, une différence fondamentale apparaît entre les fractions G et les fractions V.

Tableau XIII

DIFFERENTES ETAPES DE L'ISOLEMENT ET DE LA PURIFICATION DES
SUBSTANCES GASTROSECRETAGOGUES. EVOLUTION DE LA REPONSE
BIOLOGIQUE

<u>URINES</u>	0,5 ml — B x 2,40	
EXTRACTION CHLOROFORMIQUE	Extraction des urines à pH 10 pe 0,5 ml — B x 2,4 puis à pH 4 pe 0,5 ml — B x 2 Les extraits sont rassemblés.	
<u>CHROMATOGRAPHIES</u>		
- SEPHADEX G 25	pic 3 pe 0,5 ml — B x 3	pic 6 pe 0,5 ml — B x 3
- AMINOETHYLCELLULOSE	1 fraction biologiquement active pe 0,2 ml — B x 3	1 fraction biologiquement active pe 0,2 ml — B x 3
- PURIFICATION SUR SEPHADEX G 10	pe 0,2 ml — B x 3	pe 0,2 ml — B x 3

Δ chaque stade sont indiqués :

- pe : prise d'essai : la quantité d'urine ou l'équivalence en urines brute injectée au Rat (technique de Gosh Laï), la réponse biologique est exprimée par le facteur de multiplication de la sécrétion basale (B) de l'animal.

L'injection de gastrine, sur le rat selon la technique de Gosh LaI, provoque une élévation de la sécrétion acide gastrique après 10 minutes et le maximum de la réponse est à peu près constamment situé entre la 20 et la 30ème minute, puis la sécrétion décroît et revient à sa valeur basale.

L'injection de la fraction G provoque une réponse de même style.

Par contre la fraction V entraîne une réponse sécrétoire immédiate et d'emblée intense ; le maximum de la concentration acide se trouve atteint dans les dix premières minutes et le retour à la sécrétion de base s'effectue dès la vingtième minute.

b) Chez le chien

Il convient de distinguer dans ces résultats, d'une part le type de fraction injectée, G ou V, et d'autre part, les montages expérimentaux utilisés.

1/ Pic G

La perfusion veineuse de la fraction G provoque une stimulation de la sécrétion acide lorsque l'on ajoute l'injection par voie sous cutanée, de cholinergique.

Le tableau XIV montre les valeurs obtenues sur chiens munis d'une fistule et d'une poche de Heidenhain.

Tableau XIV

Réponse sécrétoire chez le chien à l'injection de la fraction G sous dose subliminaire de cholinergique

Temps mn	FISTULE					POCHE de HEIDENHAIN					
	Volume total ml	Acidité libre		Pepsine Conc. µg tyrosine li- béré par ml de suc gastrique	Débit µg tyro- sine	Volume total ml	Acidité libre		Pepsine Conc. µg tyrosine li- béré par ml de suc gastrique.	Débit mg tyrosine	
		Conc. mEq/l	Débit mEq				Conc. mEq/l	Débit mEq			
Secrétion basale	Gttes										
<u>0.1 ml/kg/30'</u>	Gttes 1,0	pH 3,5 pH 3,5									
<u>0.2 ml/kg/30'</u>	45 60	1,0 1,0	pH 4 pH 4								
<u>0.4 ml/kg/30'</u>	75 90 105 120 135	7,0 20,0 21,0 15,0 3,0	40 126 120 130 100	0,280 2,520 2,520 1,950 0,300	110 5,90 590 420 340		0,770 14,800 12,390 6,300 1,020	1,5 1,5 1,2 1,0	12 50 70 60	0,018 0,075 0,084 0,60	1,510
<u>0.8 ml/kg/30'</u>	150	Gttes	pH 3,5			Gttes	pH 3,5				

D'autres expérimentations montrent qu'il est difficile d'obtenir une stimulation importante sans adjonction d'une dose infralinéaire de cholinergique ; l'étude des doses faibles de gastrine antrale nécessite cette même potentialisation.

Sans cholinergique, pour des doses injectées identiques, les débits de sécrétion acide sont très diminués, de l'ordre de 0,100 à 0,200 mEq, sur les fistules et on n'observe pas de stimulation de la poche de Heidenhain.

2/ Pic V

Les doses injectées, rapportées aux urines sont beaucoup plus faibles que pour la fraction G, sur les fistules. On peut sensibiliser la réponse à l'aide de substances cholinergiques et obtenir une sécrétion avec des quantités infimes de produit.

La réponse est très rapide et intense d'emblée, comme le montrent le tableau suivant : Tableau XV.

Sur la poche de Heidenhain, la stimulation s'observe pour des quantités de produits de l'ordre de 0,1 ml/kg/30 mn sans cholinergique. La réponse est moins précoce et nécessite un plus grand délai pour atteindre son maximum (tableau XVI).

La stimulation de la sécrétion acide se manifeste lorsque l'on associe les deux fractions pour des doses injectées équivalentes à de très faibles volumes d'urines. Tableau XVII.

Tableau XV

REPOSE SECRETOIRE CHEZ LE CHIEN A L'INJECTION DE LA FRACTION V

	CHIEN 1 FISTULE avec Cholinergique				Concentra- tion µg de ty- rosine par ml suc gastrique PEPSINE	
	Temps minutes	Volume ml	Concentra- tion mEq/l	Débit mEq		Débit mg de tyrosine
ACIDITE						
<u>0,0025 ml/kg/30'</u>	0					
	15	3,0	pH 7			
	30	2,5	10	0,025		
	45	1,0	10	0,010		
	60	salive				
<u>0,005 ml/kg/30'</u>	75	3,5	pH 7			
	90	5,0	48	0,240	660	3,300
	105	1,5	30	0,045	600	0,900
	120	0,6	20	0,012		
	135	0,3	pH 7			
	150	salive				
CHIEN 2 FISTULE sans Cholinergique						
<u>0,02 ml/kg/30'</u>	0					
	15	3,0	pH 4			
	30	2,5	56	0,140	600	1,500
	45	1,5	100	0,150		
	60	1,5	64	0,096		
	75					
<u>0,1 ml/kg/30'</u>	90	1,0	pH 7			
	105	1,0	pH 4			
<u>0,2 ml/kg/30'</u>	120	2,0	pH 4			
	135					

REPONSE SECRETOIRE CHEZ LE CHIEN A L'INJECTION DE LA FRACTION V

CHIEN 3 Poche de HEIDENHAIN sans Cholinergique ACIDITE PEPSINE					
Temps (minutes)	Volume (ml)	Concentration (mEq/l)	Débit (mEq)	Conc. µg de tyrosi- ne libérée par ml de suc gastrique	Débit (mg de tyrosine)
<u>0,025 ml/kg/30'</u>					
0					
15	0,1				
30	0,1	"			
45	0,2	"			
60	0,2	"			
75	0,5	pH 4			
90	0,5	-			
105	0,5	-			
120	0,5	-			
135	1,0	pH 4			
150	1,0	20	0,020		
165	0,5	28	0,014	)	
180	1,9	50	0,025	(660	2,706
195	2,2	80	0,176	)	
210	1,9	84	0,160	500	0,950
225	0,7	84	0,059		
<u>0,05 ml/kg/30'</u>					
<u>0,1 ml/kg/30'</u>					

Tableau XVII

REPONSE SECRETOIRE CHEZ LE CHIEN A L'INJECTION DES DEUX FRACTIONS V et G SANS CHOLINERGIQUE

	Temps (minute)	Volume (ml)	ACIDITE		PEPSINE	
			Concentration (mEq/l)	Débit (mEq)	Conc. μ g de Tyrosi- ne libérée par ml de suc gastrique	Débit mg de tyrosine
G + V <u>0,05 ml/kg/30'</u>	15	6,0	10	0,060	470	2,820
	30	7,5	20	0,150	330	2,475
G + V <u>0,1 ml/kg/30'</u>	45	5,5	48	0,264	290	1,595
	60	3,0	40	0,120	310	0,930

Par comparaison nous représentons dans le tableau XVIII la réponse sécrétoire obtenue sur l'urine brute de Mm M... Le test a été pratiqué sur un chien muni d'une poche de Heidenhain sensibilisée par un cholinergique. La réponse à l'injection de 0,01 ml/kg/30 mn est nette et correspond à un test P.S.U. largement positif chez le rat.

6°- Conclusions

Il apparait que au cours du Syndrome de Zollinger-Ellison, les urines éliminent deux types de métabolites gastrosecrétagogues.

La composition élémentaire en acides aminés ainsi que l'activité biologique sont des arguments en faveur de la présence de métabolites gastriniques, représentés par la fraction G. Nous ne pouvons cependant pas, dans l'état actuel de nos moyens, identifier complètement G à la gastrine antrale.

En effet, nous ne disposons pas d'une quantité suffisante de substance pour pratiquer des électrophorèses à plusieurs pH et comparer les résultats avec ceux obtenus à partir de la gastrine elle-même.

En second lieu nous ne disposons pas encore du dosage radioimmunologique de la Gastrine pour apporter un argument immunologique.

Enfin, et nous pensons qu'il s'agit d'une critique d'ordre méthodologique, l'élution de cette fraction G de l'Aminoéthylcellulose n'exige

Tableau XVIII
 REPONSE SECRETOIRE CHEZ LE CHIEN AUX URINES DE Mme M...

Poche de Heidenhain avec Cholinergique

	Temps (minutes)	Volume total (ml)	Acidité libre		*
			Concentration (mEq/l)	Débit (mEq)	
0,01 ml/kg/30'	0				
	15	0,2	pH 4		
	30	0,7	40	0,018	
	45	0,6	70	0,042	
	60	1,0	80	0,080	
	75	1,7	98	0,167	
	90	0,7	98	0,069	
	105	0,3	pH 3,5		
* La mesure de l'activité protéolytique n'a pu être pratiquée en raison des faibles volumes de sécrétion.					

pas les concentrations de 0,250 ou 0,275 de bicarbonate d'ammonium. Cette fraction est en effet éluée sitôt la mise en oeuvre du gradient d'élution (0,050 M de bicarbonate d'ammonium).

Nous pensons qu'avec 2 résidus Aspartyl et 5 résidus Glutanyl l'élution de ce peptide aurait dû nécessiter une valeur encore plus élevée en bicarbonate d'ammonium. Mais il est à noter qu'il existe des acides aminés basiques qui modifient probablement l'excitabilité des radicaux carboxyliques dans les conditions de pH où nous avons travaillé. De plus, il est possible que le chloroforme ait pu modifier la structure de la molécule au point qu'elle ne se fixe qu'à peine sur la résine.

Quant à la fraction V, sa composition élémentaire en aminoacides est différente et ne permet pas à priori de penser qu'il s'agit d'un métabolite gastrinique. Le fait que cette fraction soit retenue sur Aminoéthylcellulose et nécessite une concentration importante de bicarbonate d'ammonium, montre que les charges électro négatives sont suffisamment excitées, malgré la présence des aminoacides basiques. Ceci suggère que le chloroforme ne modifie pas la structure de ce peptide.

L'activité biologique de cette fraction V, tant chez le rat que chez le chien muni d'une fistule est différente à plusieurs titres :

1/ Les doses stimulantes sont faibles. Si l'on admet la concentration de 8 µg par litre d'urine, pour stimuler un chien de 20 kg, nous avons injecté avec un cholinergique des quantités de l'ordre de 0,4-0,8 nanogrammes pour une demi-heure alors que selon le même calcul, la stimulation par la fraction G nécessite 100 nanogrammes.

2/ La réponse est moins importante que pour la fraction G mais plus rapide et atteint très rapidement son maximum.

Malgré un certain nombre d'imprécisions de nos résultats, nous pensons pouvoir conclure qu'il existe dans les urines, au cours du Syndrome de Zollinger-Ellison, deux types différents de polypeptides gastrosecrétagogues : - les uns constitués par des métabolites apparentés à la Gastrine,

- les autres qui ne possèdent pas de filiation évidente avec l'hormone antrale et dont nous ignorons le rôle.

CONCLUSIONS

1°- RESULTATS OBTENUS AU COURS DE CE TRAVAIL

L'hypothèse formulée comme point de départ de ce travail, à savoir que dans les urines de sujets atteints de Syndrome de Zollinger-Ellison, le pouvoir gastrosécrétagogue détecté par le test P.S.U.*était supporté par la Gastrine, ne s'est révélée exacte qu'en partie seulement.

La préparation de la Gastrine nous a fourni un certain nombre d'enseignements sur le plan biochimique et sur le plan biologique.

Sur le plan biochimique, nous savons comment se comporte l'hormone en chromatographie sur Sephadex et sur AminoEthylCellulose. L'analyse des acides aminés du produit purifié permet une caractérisation et un dosage. L'électrophorèse met en évidence les deux formes de l'heptadécapeptide.

Sur le plan biologique nous connaissons le type de réponse sécrétoire qu'il faut attendre : une réponse de la sécrétion acide importante dont le maximum apparaît après un délai moyen de 30 minutes et qui, selon les doses utilisées, peut se prolonger assez longtemps. La sécrétion peptique paraît proportionnellement peu stimulée.

A partir des urines de sujets atteints de Syndrome de Zollinger-Ellison, nous nous trouvons en présence de deux fractions différentes

...

* P.S.U. : Pouvoir Secrétagogue Urinaire

quant à leur comportement chromatographique et leur pouvoir de stimulation vis-à-vis de la sécrétion gastrique.

La fraction que nous avons dénommée fraction G est éluée sur Sephadex G 25 avec un coefficient d'élution de 1,80 ce qui est en faveur d'un poids moléculaire relativement élevé. Sur AminoEthylCellulose cette fraction est à peine retenue ; ceci est en apparence contradictoire avec la composition élémentaire en acides aminés, ce peptide possédant des acides aminés acides. Nous pensons que le chloroforme peut être responsable de l'inactivité des groupements carboxyliques. Néanmoins, ce peptide comprend les acides aminés constitutifs de la Gastrine. Mais il est vraisemblable que l'hormone n'est pas éliminée sous la forme d'heptadécapeptide et au cours de son catabolisme, la molécule est probablement modifiée, ceci peut expliquer la présence dans la fraction G d'autres aminoacides.

La fraction V est différente : son coefficient d'élution sur Sephadex est de 2,70. Son poids moléculaire est donc plus petit. Son comportement sur AminoEthylCellulose est en rapport avec la composition élémentaire en acides aminés, celle-ci montre par ailleurs des différences notables vis-à-vis de la Gastrine et vis-à-vis de la fraction G.

Ces deux fractions présentent des propriétés gastrosecrétagogues en particulier sur la sécrétion acide, potentialisées par l'addition à doses sub-liminales de cholinergiques.

2°- Pour tenter d'expliquer la présence des deux substances gastro-
secrétagogues urinaires au cours du Syndrome de Zollinger-Ellison, il nous paraît indispensable de souligner certaines données.

a) Depuis les travaux de R.A. GREGORY publiés en 1964 (20) un certain nombre de notions ont été précisées concernant l'hormone antrale.

1. La synthèse de la molécule de Gastrine a été réalisée, ainsi que celle de nombreux peptides proches de l'heptadécapeptide. J.S. MORLEY et H. GREGORY (12, 17, 18, 39) et R.A. GREGORY et H.J. TRACY (49) ont démontré que l'activité biologique est presque entièrement supportée par le tétrapeptide C terminal.

... TRY - IET - ASP - Phe NH₂

MORLEY (40, 41) démontre également que l'activité biologique diminue si l'on change la nature d'un seul acide aminé de ce tétrapeptide ; en particulier le fait de modifier en quoi que ce soit le radical aspartyl fait perdre toute activité gastrosecrétagogue.

Sur la base de ces travaux, ces auteurs ont synthétisé une tétra et une pentagastrine, utilisées comme stimulant de la sécrétion gastrique au cours des études sécrétoires chez l'homme.

2. Les recherches immunologiques confirment ces faits. McGUIGAN et Coll. (33) ont obtenu des anticorps anti-tétrapeptide C terminal et ils montrent que l'injection de ces anticorps inhibe l'activité de la Gastrine endogène (24, 26). De plus, l'injection de Gastrine ayant été en contact avec ces anticorps ne provoque aucune stimulation de la sécrétion (25).

Il résulte donc de ces faits que le radical C terminal est indispensable à l'activité biologique de type gastrinique.

b) Le syndrome de Zollinger-Ellison a été étudié tant sur le plan biologique, chimique et immunologique.

1. On sait que les urines des sujets atteints de cette maladie sont douées d'un pouvoir gastrosecrétagogue (4) (P.S.U.) sur la sécrétion gastrique du Rat.

Il en est de même pour le sérum (45) (P.S.S.)*

On a pu préciser par électrophorèse que seule la fraction albuminique (1) est le support de cette activité biologique.

2. R.A. GREGORY en 1967 a montré qu'un extrait de la tumeur pancréatique au cours de ce syndrome stimule la sécrétion gastrique (21).

En 1969 il en isole les 2 formes de Gastrine, G I et G II (22).

Dès 1961, WADDEL et coll (36) avaient déjà souligné que des anticorps antigastrique pouvaient inhiber les capacités de stimulation d'un extrait de la tumeur,

3. L'étude radioimmunologique de la Gastrine circulante, par YALOW et BERSON (54) montre qu'il existe deux types de substances immunoréactives. Ces auteurs pensent qu'une des formes serait la Gastrine définie par R.A. GREGORY et l'autre forme d'un poids moléculaire plus élevé (7 000) serait une "big gastrin" B.G. Ces deux formes se trouvent présentes dans les sérums normaux, mais la B.G. surtout existe à un taux très élevé dans les sérums des sujets atteints de Syndrome de Zollinger Ellison.

Par la même méthode radioimmunologique (53) ces auteurs montrent que ces deux formes existent dans des extraits de muqueuse antrale, duodénale et jéjunale (6).

...

* P.S.S. = Pouvoir Secrétagogue du Sérum.

McGUIGAN (34) montre qu'il existe dans les urines des sujets atteints du Syndrome de Zollinger-Ellison, de la Gastrine immunologiquement réactive, mais il souligne que la quantité d'hormone ainsi mise en évidence est très faible, ne paraissant pas suffisante pour expliquer l'activité biologique mise en évidence par le test P.S.U.

4. Il semble exister une bonne corrélation entre l'activité biologique et immunologique en ce qui concerne les deux fractions isolées du sérum. Mais cette corrélation n'a pu être établie à propos des urines.

3°- En raison de ces résultats nous pouvons émettre les hypothèses suivantes :

a) La fraction G, si elle correspond effectivement à la Gastrine comprend le tétrapeptide C terminal ce qui explique son activité. La potentialisation par un cholinergique met en évidence une réponse même pour des doses très faibles de substances en perfusion veineuse de l'ordre de 100 nanogrammes par demi-heure chez un chien de 20 kg.

Nous pensons que cette fraction peut être un métabolite urinaire de l'une des deux ou des deux types de gastrine circulante, et qu'elle existe en quantité relativement importante dans le syndrome de Zollinger-Ellison, provenant de la Gastrine tumorale.

b) La fraction V ne possède pas le tétrapeptide C terminal ce qui doit exclure une activité biologique de type gastrinique et supprimer sa réactivité vis-à-vis des anticorps spécifiques de la gastrine.

Pour expliquer la présence de ce peptide, actif sur la sécrétion acide à des doses très faibles, nous émettons deux hypothèses :

...

1. La fraction V est associée à la fraction G pour constituer la Big Gastrin de YALOW et BERSON. Les procédés d'extraction ont scindé cette molécule et nous avons trouvé les deux fragments.

Il faut alors admettre que le peptide accroît considérablement l'activité biologique de la Gastrine, mais nous restons dans l'ignorance quant à son lieu de production. Dans cette hypothèse, nous devrions isoler V à partir d'urines à pouvoir secrétagogue urinaire dans d'autres cas physiopathologiques d'hypergastrinie (Anémie de Biermer par exemple).

2. La fraction V est une production spécifique de la tumeur ou du pancréas stimulé par le processus tumoral, douée également d'un pouvoir gastrosecrétagogue. Seule la finesse des tests biologiques, en particulier chez le rat selon le montage de Laï, nous a permis de détecter ce pouvoir stimulant pour des quantités de produit beaucoup plus faibles que pour la Gastrine.

B I B L I O G R A P H I E

1. ACCARY J.P., DUBRASQUET M., VATIER J., BONFILS S.
Activité gastrinique des fractions albuminique et globulinique du sérum
C. R. Soc. Biol. 1969 163 65
2. ANDERSON J.C., BAATON M.A., GREGORY R.A., HARDY P.M., KENNEN, McLEOD J.F.,
PRESTON J., SHEPPARD R.C., MORLEY J.S.
The antral hormone gastrin. Synthesis of gastrin.
Nature 1964 204 933
3. BADER J.P., BONFILS S., FERRIER J.P., DUBRASQUET M., POTET F., MARTIN E.,
THIERY J.P., LAMBLING A.
Le syndrome de Zollinger-Ellison. Etude clinique, biologique et
anatomique de 10 observations.
Presse Med. 1967 75 2709
4. BADER J.P., BONFILS S., LAUDAT Ph., DUBRASQUET M., LAMBLING A.,
Le pouvoir gastro-sécrétagogue des urines dans le syndrome de
Zollinger-Ellison.
Rev. Int. Hepat. 1966 16 723
5. BERSON S.A., WALSH J.H., YALOW R.S.
Radioimmunoassay of gastrin in human plasma and regulation of
gastric secretion.
Sous presse.

.../...

6. BERSON S.A., YALOW R.S.
Nature of immunoreactive Gastrin extracted from tissues of gastro-intestinal tract.
Gastroenterology 1971 60 215
7. BONFILS S., BADER J.P., DUBRASQUET M., LAMBLING A.
Dépistage dans les urines humaines de substances excitant la sécrétion gastrique du rat.
C. R. Soc. Biol. 1963 157 259
8. BONFILS S., ROSSI G., LAMBLING A.
Technique de fistule transduodéno-gastrique chez le rat.
Rev. Franç. Et. Clin. Biol. 1958 3 977
9. BONFILS S., MIGNON M., BADER J.P., VATIER J., DUBRASQUET M., ZEITOUN P.
L'exploration des fonctions sécrétoires de l'estomac.
Rev. Prat. Paris 1968 18 1351
10. BONFILS S., LEWIN M., DUBRASQUET M., VATIER J.
Etude de la corrélation acide-peptique (coefficient K 25) pour l'analyse des facteurs de stimulation de la sécrétion gastrique basale.
In "Modern Gastroenterology" Pr. O. Gregor and Doz. Riede, Prague Ed., F.K. Schattauer Verlag Stuttgart, New York, 1969, 93.
11. BONFILS S.
Le syndrome de Zollinger-Ellison. Problèmes diagnostiques et thérapeutiques.
Rev. Prat. Paris, 1969 19 2931
12. DAVEY J.M., LAIRD A.H., MORLEY J.S.
The synthesis of the C terminal tetrapeptide sequence of Gastrin, its optical isomers, and acylated derivatives.
J. Chem. Soc. 1966 555

.../...

13. DRAGSTEDT L.R., WALTON B.C., WOODWARD E.R.
Gastrin, a stimulant of pepsin secretion.
Arch. Surg. 1963 86 304
14. EDKINS J.S.
On the chemical mechanism of gastric secretion.
Proc. Roy. Soc. B. 1905 76 376
15. EDKINS J.S.,
The chemical mechanism of gastric secretion.
J. Physiol. 1906 34 183
16. FLODIN P.
Dextran gels and their application in gel filtration.
Thèse Pharmacia (Uppsala - Suède).
17. GREGORY H.
Some polypeptides influencing gastric acid secretion.
Dig. Diseases 1970 15 141
18. GREGORY H., HARDY P.M., JONES D.S., KENNER G.W., SHEPPARD R.C.
The antral hormone gastrin. Structure of Gastrin.
Nature 1964 204 931
19. GREGORY R.A., TRACY H.J.
The preparation and properties of gastrin.
J. Physiol. 1961 156 523
20. GREGORY R.A., TRACY H.J.
The constitution and properties of two gastrins extracted from
hog antral mucosa.
Part I : Isolation of two gastrins from hog antral mucosa.
Part II : The properties of two gastrins isolated from hog antral
mucosa.
Gut 1964 5 103 and 107

21. GREGORY R.A., GROSSMAN M.I., TRACY H.J., BENTLEY P.H.
Nature of the gastric secretagogue in Zollinger-Ellison tumors.
The Lancet 1967 543
22. GREGORY R.A., TRACY H.J., AGARWAL K.L., GROSSMAN M.I.
Aminoacid constitution of two gastrins isolated from Zollinger-
Ellison tumor tissue.
Gut 1969 10 603
23. GROSSMAN M.I., ROBERTSON C.R., IVY A.C.
Proof of a hormonal mechanism for gastric secretion.
The humoral transmission of the distention stimulus.
Amer. J. Physiol. 1948 153 1
24. JAFFE B.M., NEWTON W.T., McGUIGAN J.E.
In vivo inhibition of endogenous gastrin activity with antibody to
the C terminal tetrapeptide of Gastrin.
Gastroenterology 1969 56 1255
25. JAFFE B.M., NEWTON W.T., McGUIGAN J.E.
Inhibition of gastrin activity by incubation with antibodies to the
C terminal tetrapeptide of Gastrin.
Surgery 1969 65 633
26. JAFFE B.M., NEWTON W.T., McGUIGAN J.E.
Inhibition of endogenous gastrin activity by antibodies to the
carboxyl-terminal tetrapeptide amide of gastrin.
Gastroenterology 1970 58 151
27. KOMAROV S.A.
Gastrin.
Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. 1938 38 514

.../...

28. KOMAROV S.A.

Studies on Gastrin.

I. Methods of isolation of a specific gastric secretagogue from the pyloric mucous membrane and its chemical properties.

Rev. Canad. Biol. 1942 1 191

29. KOMAROV S.A.

Studies on Gastrin.

II. Physiological properties of the specific gastric secretagogue of the pyloric mucous membrane.

Rev. Canad. Biol. 1942 1 377

30. LAI K.S.

Studies on Gastrin : a method of biological assay of gastrin.

Gut 1964 5 327

31. LAMBLING A., BONFILS S., BADER J.P., DUBRASQUET M.

Le pouvoir secrétagogue gastrique des urines (P.S.U.) de l'homme.

Interêt clinique, en particulier dans le Syndrome de Zollinger-Ellison.

Gastroenterologia 1965 103 152

32. LEWIN M., BONFILS S.

Etude statistique de la corrélation "acide-pepsine" (K 25) dans le suc gastrique humain à l'état normal et pathologique.

Rev. Franç. Et. Clin. Biol. 1968 13 780

33. McGUIGAN J.E.

Antibodies to the C-terminal tetrapeptide amide of gastrin.

Gastroenterology 1968 54 1012

.../...

34. MCGUIGAN J.E.
Measurement of hypergastrinemia in the Zollinger-Ellison Syndrome.
Clin. Res. 1968 16 2
35. MIGNON M., BONFILS S.
Technique de construction d'une poche de Heidenhain chez le chien.
Presse Med. 1967 75 2337
36. MONACO A.P., LYTHGDE J.P., WADDELL W.R.
Immunological study in the Zollinger-Ellison Syndrome.
Lancet 1961 2 1016
37. MOORE S., STEIN W.H.
Procedures for the chromatographic determination of aminoacids on
four per cent cross linked sulfonated polystyrène resins.
J. Biol. Chem. 1954 211 895
38. MOORE S., STEIN W.H.
Chromatography of Aminoacids on sulfonated polystyrene resins.
J. Biol. Chem. 1951 192 663
39. MORLEY J.S.
Synthesis of human gastrin (H.I.)
J. Chem. Soc. 1967 2410
40. MORLEY J.S.
Structure activity relationships.
Fed. Proc. 1968 27 1314
41. MORLEY J.S.
Structure function relationships in Gastrin-like peptides.
Proc. Roy. Soc. B. 1968 170 97

42. MORLEY J.S.

Gastrin and related synthetic peptides structure-activity relationships.
Fed. Proc. 1968 27 1314

43. PORATH J., FLODIN P.

Gel filtration : a method for desalting and group separation.
Nature 1959 183 1637

44. PORATH J.

Fractionation of polypeptides and proteins on dextran gels.
Clin. Chim. Acta. 1959 4 776

45. SIRCUS W.

Evidence for a gastric secretagogue in the circulation and gastric juice of patients with the Zollinger-Ellison Syndrome.
Lancet 1964 2 1971

46. STEIN W.H., MOORE S.

Chromatographic determination of the Aminoacid composition of proteins.
Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 1949 14 179

47. TAUBER S.D., MADISON L.L.

Isolation, physicochemical and physiological characterization of Gastrin.
Amer. Soc. for Clin. Invest. Proc., 56th Annual Meeting 1271

48. TRACY H.J.

Gastrin.
Thèse Doctorat, University of Liverpool 1964

49. TRACY H.J., GREGORY R.A.

The antral hormone Gastrin : Physiological properties of a serie
of synthetic peptides structurally related to Gastrin I.
Nature 1964 204 935

50. UVNAS B.

The part played by the pyloric region in the cephalic phase of
gastric secretion.

Acta Physiol. Scand. 1942 4 suppl. XIII

51. VATIER J., BONFILS S., BADER J.P., DUBRASQUET M., LAUDAT Ph.

Islement chromatographique (Séphadex) du facteur P.S.U. dans les
urines de sujets atteints de Syndrome de Zollinger-Ellison.

Path. Biol. 1966 14 358

52. VATIER J., CHERET A.M., BONFILS S.

Le dosage automatique de l'activité protéolytique du suc gastrique.

Biol. Gastroënt. 1968 1 15

53. YALOW R.S., BERSON S.A.

Radioimmunoassay of Gastrin.

Gastroenterology 1970 58 1

54. YALOW R.S., BERSON S.A.

Further studies on the nature of immunoreactive Gastrin in human plas-
ma.

Gastroenterology 1971 60 203

55. ZOLLINGER R.M., ELLISON E.H.

Primary peptic ulceration of the jejunum associated with islet cell
tumors of the pancreas.

Ann. Surg. 1955 142 709

Vu le Président de Thèse

Pr DEBRAY

Vu le Doyen de la Faculté

J. BAUMANN

Vu le Permis d'imprimer

le Recteur de l'Académie de Paris

R. MALLET

